



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VLIV CHEMICKÉ MODIFIKACE HUMINOVÝCH KYSELIN
NA JEJICH INTERAKCE S ORGANICKÝMI IONTY**

EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATION OF HUMIC ACIDS ON THEIR INTERACTIONS WITH
ORGANIC IONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Eva Fryšová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0975/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Eva Fryšová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Vliv chemické modifikace huminových kyselin na jejich interakce s organickými ionty

Zadání diplomové práce zadání:

1. Vypracovat zevrubnou literární rešerši na téma diplomové práce.
2. Na základě literární rešerše navrhnout a realizovat sérii experimentů zaměřenou na posouzení vlivu chemické struktury huminových kyselin a jejich modifikace na interakci s organickými ionty.
3. Interpretovat získaná experimentální data v kontextu současného stavu znalostí dané problematiky, navrhnout směřování navazujících experimentálních prací.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Eva Fryšová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá interakcí huminových kyselin s iontovými organickými sloučeninami a vlivem chemické modifikace huminových kyselin na tuto interakci. Modelovým organickým iontem bylo zvoleno barvivo rhodamin 6G. Interakce byly zkoumány pomocí zhášení fluorescence, dialýzy v difúzních celách a diferenční UV-VIS spektroskopie. Výsledky ukázaly, že vazba mezi reaktanty nebyla primárně závislá na karboxylových funkčních skupinách huminových kyselin. Fluorescenční experimenty indikovaly statický mechanismus zhášení a diferenční UV-VIS spektroskopie prokázala existenci π - π interakcí.

ABSTRACT

This master thesis deals with the interaction of humic acids with organic ions and effect of chemical modification of humic acids on this interaction. Rhodamine 6G was used as a model organic ion. The interaction were studied by fluorescence quenching, dialysis in diffusion cells and differential UV-VIS spectroscopy. Results showed that the bond between the reactants was not primarily dependent on carboxylic functional groups of humic acids. Fluorescence experiments indicated static quenching mechanism and differential UV-VIS spectroscopy demonstrated the existence of π - π interactions.

KLÍČOVÁ SLOVA

Huminové kyseliny, rhodamin 6G, modifikace, zhášení fluorescence, dialýza, difúzní cely, organické ionty

KEY WORDS

Humic acid, rhodamine 6G, modification, fluorescence quenching, dialysis, diffusion cells, organic ions

FRYŠOVÁ, E. *Vliv chemické modifikace huminových kyselin na jejich interakce s organickými ionty*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 74 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za vynikající přístup, vedení a cenné rady poskytnuté při řešení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marcele Laštůvkové, Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. a Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za pomoc v experimentální části této práce. Speciální poděkování patří mé rodině a přátelům za neustálou podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Humus a huminová hmota	9
3.2	Huminové látky	9
3.2.1	Rozdělení	9
3.2.2	Výskyt	10
3.2.3	Vznik	10
3.2.4	Struktura	11
3.2.5	Modifikace	13
3.2.6	Využití	13
3.3	Principy využitých experimentálních technik	14
3.3.1	Fluorescence	14
3.3.2	Dialýza	20
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
4.1	Vliv funkčních skupin na reaktivitu huminových kyselin	22
4.2	Interakce huminových kyselin s organickými ionty	23
4.2.1	Interakce s barvivy	23
4.2.2	Interakce s biocidy	25
4.2.3	Interakce s dalšími iontovými organickými látkami	26
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
5.1	Použité chemikálie a spotřební materiál	28
5.2	Použité přístroje	28
5.3	Izolace a úprava vzorků huminových kyselin	29
5.3.1	Extrakce z lignitu	29
5.3.2	Selektivní methylace	29
5.4	Charakterizace huminových vzorků	30
5.5	Fluorescenční experimenty	31
5.5.1	Příprava vzorků	31
5.5.2	Měření emisních spekter	31
5.5.3	Korekce emisních spekter	32

5.5.4	Měření doby života fluorescence	32
5.6	Dialyzační experimenty	33
5.6.1	Postup měření	33
5.7	Diferenční UV-VIS	34
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
6.1	Charakterizace huminových vzorků	35
6.1.1	Elementární a termogravimetrická analýza	35
6.1.2	FT-IR spektroskopie	37
6.1.3	SEC-MALS	38
6.2	Zhášení fluorescence	39
6.3	Rovnovážná dialýza	42
6.3.1	Kalibrační přímka	43
6.3.2	Stanovení zdánlivých rovnovážných konstant	44
6.4	Diferenční UV-VIS	49
7	ZÁVĚR	52
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	60
10	PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

S dynamicky se rozvíjející průmyslovou a zemědělskou výrobou roste také požadavek na ochranu životního prostředí. Nešetrná průmyslová výroba, nadměrné používání pesticidů či nevhodné nakládání s odpady znečišťuje půdu, ovzduší i povrchové a podzemní vody. Také rostoucí výroba farmaceutik a jiných syntetických organických látek může zvyšovat přítomnost těchto substancí a jejich mnohdy toxických metabolitů v přírodních zdrojích, což představuje riziko pro zdraví lidí i okolní faunu. Pro zachování kvality ekosystému je proto nutné tato znečišťování eliminovat a předcházet jim. Jedno z řešení tohoto celosvětového problému mohou představovat huminové látky. Jedná se o látky s unikátní chemickou strukturou a přirozeným výskytem v půdě i v řadě jiných přírodních materiálů. Právě díky své jedinečné chemické struktuře s velkým množstvím různorodých funkčních skupin mají huminové látky schopnost interagovat s mnoha druhy polutantů a tím napomáhat při jejich odstraňování z přírodních zdrojů. Bohatá zásoba alternativních zdrojů huminových látek navíc motivuje úsilí o umělé navyšování obsahu těchto látek pro zvýšení detoxikačních schopností daného zdroje. K úspěšnému odstranění znečišťujících látek nebo k eliminaci jejich toxických účinků je však potřeba důkladně a co nejlépe porozumět mechanismu interakce konkrétních polutantů s huminovými látkami. Již mnoho autorů přispělo svými pracemi na téma interakcí huminových látek s širokou škálou polutantů (např. těžkými kovy, pesticidy, odpadními barvivy, tensidy, farmaceutiky apod.) do celkového stavu poznání. To svědčí o velkém vědeckém zájmu o huminové látky a jejich využití k ochraně a zlepšení životního prostředí.

Tato diplomová práce se věnuje studiu interakce huminových kyselin, jedné z frakcí huminových látek, s vybraným zástupcem iontových organických sloučenin. Povahu organických iontů totiž představuje celá řada polutantů, jako jsou pesticidy, tensidy nebo odpadní barviva, jež mohou znečišťovat přírodní zdroje. Práce přináší náhled zejména na strukturní aspekt při interakci obou reaktantů, zaměřený na funkční skupiny huminových látek podílejících se na vazbě s organickým iontem.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat zevrubnou literární rešerši na téma diplomové práce. Na základě této rešerše bylo následně cílem navrhnout a realizovat na vlastních izolovaných vzorcích sérii experimentů zaměřených na vliv chemické struktury huminových kyselin a její modifikace na interakci s organickými ionty. Dále bylo cílem interpretovat získaná experimentální data v souvislosti se současným stavem znalostí dané problematiky a také navrhnout směr dalších navazujících experimentů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Humus a huminová hmota

Pojem „humus“ byl hojně využíván již za dob Římanů, kde označoval půdu jako jeden velký celek. Později byl význam tohoto termínu přiřazen organické hmotě v půdě nebo kompostu a různým jejím frakcím. Waksman definoval humus jako komplexní agregát amorfních látek hnědé až tmavé barvy, který vzniká mikrobiálním rozkladem rostlinných a živočišných zbytků v půdách, kompostech, ve vodních nádržích nebo rašeliništích [1]. Tato teorie byla jednou z těch, které položily základ současného konceptu humusu.

Podle nynějších standardů je humus rozdělován na nehuminovou a huminovou složku. Do nehuminové složky humusu náleží látky vzniklé částečným rozkladem rostlinných a živočišných zbytků nebo i látky produkované rostlinami a dalšími organismy (např. lignin, lipidy, vosky, bílkoviny, aj.). Tyto substance představují výchozí materiál, ze kterého další degradací vzniká huminová složka humusu, též označovaná jako huminová hmota.

Huminová hmota je nejvíce rozšířeným materiálem obsahujícím uhlík. Vyskytuje se jak v půdách, tak i v tekoucí či stojaté vodě nebo v sedimentech, od tropických oblastí až po arktické krajiny. Rozlišuje se huminová hmota vodní, mokřadní, půdní, geologická a antropogenní. Složkami huminové hmoty jsou různé huminové látky (HL) [2].

3.2 Huminové látky

3.2.1 Rozdělení

Podle Odenových teorií (publikovaných v letech 1914 a 1919) lze huminové látky rozdělit na fulvinové kyseliny, huminové kyseliny, hymatomelanové kyseliny a humusové uhlí. Tato teorie položila základ pro koncept rozdělení, který je přijímán v dnešní době [2]. V současnosti se dle tradiční acidobazické frakcionace rozlišují tři hlavní frakce huminových látek:

Fulvinové kyseliny (FK) – rozpustné ve vodě, kyselinách i zásadách. Tato frakce má nejnižší molekulární velikost a nejvyšší reaktivitu.

Huminové kyseliny (HK) – rozpustné pouze v zásadách. Okyselením alkalického roztoku dojde k jejich precipitaci. Tato frakce má větší molekulární velikost a nižší reaktivitu než FK.

Huminy (HU) – kompletně nerozpustná frakce huminových látek. Tato frakce má největší molekulární velikost a nejnižší reaktivitu [3].

Jednotlivé frakce huminových látek se liší nejen zmíněnou acidobazickou rozpustností, velikostí a reaktivitou, ale i barvou. Fulvinové kyseliny jsou žluté až hnědočerné, huminové kyseliny jsou tmavě hnědé až černé a pro huminy je charakteristická černá barva. Tyto tři hlavní frakce HL mohou být ještě dále frakcionovány. Například hymatomelanové kyseliny, které byly dříve součástí Odenovy teorie rozdělení HL, jsou nyní považovány za podfrakci huminových kyselin vykazující rozpustnost v ethanolu [2].

3.2.2 Výskyt

Huminové látky tvoří huminovou hmotu humusu, a jsou tím pádem přirozeně rozšířeny všude po Zemi. Jejich obsah v různých přírodních materiálech je však odlišný, pohybuje se v rozsahu od stopových množství až po desítky procent. Nejvyšší zastoupení HL mají lignit, rašelina a oxyhumolit. Vybrané přírodní zdroje a obsah huminových látek v nich ukazuje *Tabulka 1* [4].

Huminové látky se dále také vyskytují prakticky ve všech přírodních vodách, kde představují 40–80 % rozpuštěného organického uhlíku. Koncentrace HL se liší i umístěním, v povrchových vodách je koncentrace těchto látek desetkrát vyšší než u vod podzemních. Ze tří hlavních frakcí huminových látek převažují ve vodách fulvinové kyseliny [5].

Tabulka 1: Zastoupení HL v přírodních zdrojích [4]

Příklad přírodního materiálu	Obsah HL [hm. %]
Humát	40–85
Rašelina	10–40
Hnědé uhlí	10–30
Půda	1–5
Černé uhlí	0–1

3.2.3 Vznik

Proces vzniku huminových látek je označován pojmem humifikace. Při tomto ději jsou různé biomolekuly, vzniklé dekompozicí mrtvých organismů a činností mikrobů, transformovány pomocí sekundárních syntetických reakcí na huminové látky [6]. Humifikace tedy zahrnuje velké množství reakcí a souvisí s koloběhem uhlíku, dusíku a organických látek v životním prostředí [4].

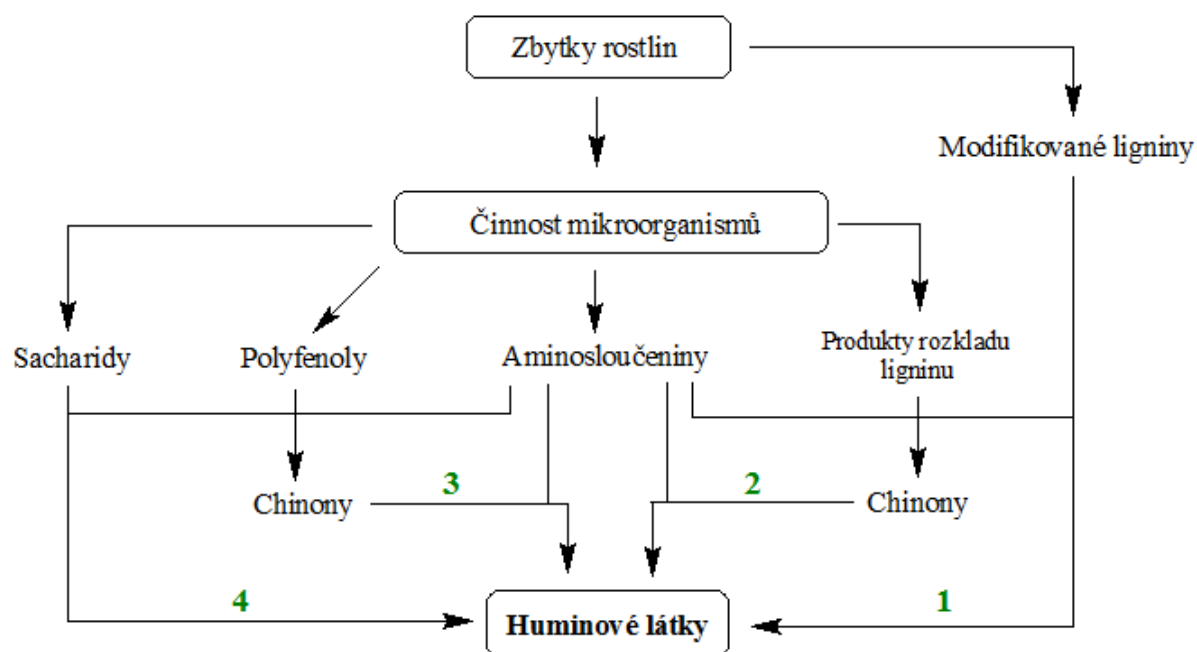
U půdních huminových látek existuje několik teorií jejich vzniku. Těmi hlavními jsou lignin – proteinová teorie, kondenzační teorie a polyfenolová teorie a jsou znázorněné a označené číslicemi na *Obr. 1*. Všechny hlavní teorie vzniku HL v půdě probíhají, avšak nestejnou rychlostí. Z praxe platí, že obvykle jedna z teorií (cest) vzniku převažuje, a to především díky různým typům půdy a podmínkám.

V rámci lignin – proteinové teorie (1) nejprve podléhá lignin díky činnosti půdních mikrobů různým modifikacím (např. oxidace karboxylových skupin na koncových řetězcích). Takto modifikovaný lignin kondenzuje s aminosloučeninami, produkovanými činností mikroorganismů. Výsledkem je humin a následně i další frakce huminových látek. Spolu s ligninem mohou být využívány i jiné rostlinné biopolymery, např. kutin nebo suberin. Tento mechanismus je dominantní především ve vlhkých a špatně odvodněných půdách.

Kondenzační teorie (4) zahrnuje kondenzaci redukujících sacharidů a aminosloučenin za vzniku N – substituovaných glykosylaminů. Následné polymerizační reakce poté vedou ke vzniku hnědě zbarvených dusíkatých produktů. Mikroorganismy zde vystupují pouze jako producenti výchozích látek a k samotné kondenzaci dochází velmi pomalu. Tato teorie vzniku

HL probíhá zejména v půdách, kde je málo ligninu a kde dochází k častým změnám podmínek.

Polyfenolová teorie (2 a 3) je nejvíce přijímanou teorií vzniku půdních HL. Je založena na rozpadu rostlinných biopolymerů na polyfenolové monomerní jednotky. V rámci této teorie dochází buď k mikrobiálnímu rozkladu ligninu (2), nebo k mikrobiálnímu rozkladu jiných rostlinných polymerů, jako jsou např. taniny, glykosidy, aj. (3). Vzniklé polyfenoly jsou následně enzymaticky pomocí polyfenoloxidázy nebo chemicky (v alkalickém prostředí) přeměněny na chinony. Tyto látky poté reagují s dusíkatými sloučeninami a polymerizují za vzniku huminových makromolekul. Polyfenoly jsou hlavními prekurzory huminových látek zejména v lesních půdách [6].



Obr. 1: Schéma teorií vzniku půdních HL podle Stevensonova (1994) [6]

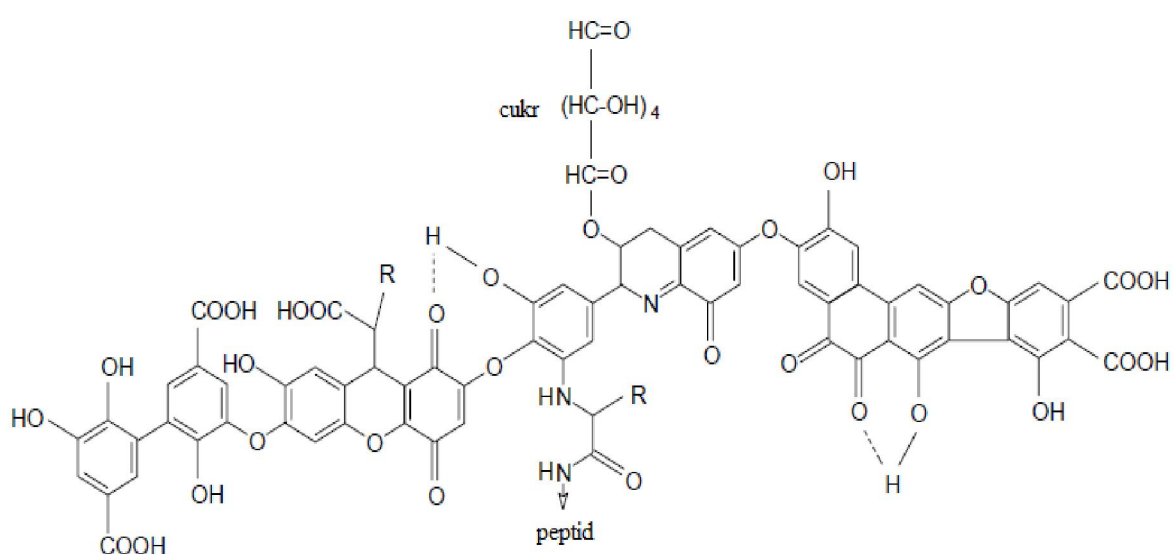
3.2.4 Struktura

Huminové látky jsou polydisperzní polyelektrolyty vykazující vysoký stupeň molekulární iregularity a heterogenity. Z tohoto důvodu nelze nalézt v přírodních zdrojích dvě identické molekuly HL, a tudíž nelze stanovit obecný strukturní vzorec. Mnoho autorů již nicméně publikovalo ve svých studiích strukturní vzorce molekulových fragmentů HL, které jsou všechny alespoň částečně správné [3]. Vybrané ukázky strukturních vzorců molekulových fragmentů jsou na Obr. 2 a Obr. 3.

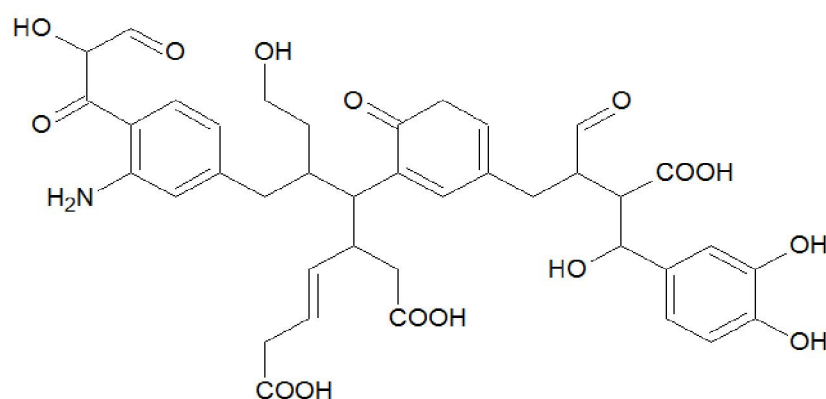
Majoritními prvky tvořící strukturu jsou uhlík, kyslík, vodík, dusík a síra, a to bez ohledu na původ HL. Rozdíly jsou však patrné v procentuálním zastoupení těchto prvků mezi jednotlivými frakcemi HL (např. fulvinové kyseliny mají větší obsah kyslíku než huminové kyseliny) i vlivem různého zdroje HL (např. huminové kyseliny z leonarditu mají více uhlíku než huminové kyseliny z rašeliny).

Molekulová hmotnost těchto látek se pohybuje v rozmezí 2–1300 kDa. Ve struktuře HL lze nalézt velké množství rozmanitých funkčních skupin (karboxylových, fenolových, enolových, chinonových, etherových, aj.), jejichž obsah závisí na původu, stáří, klimatu či podmínkách extrakce. Nejčastějšími a hlavními interakčními funkčními skupinami v molekulách HL jsou skupiny karboxylové a fenolové. Struktura HL, charakterizovaná rozličnými funkčními skupinami různého obsahového zastoupení, je zodpovědná za dané vlastnosti HL, jako jsou např. rozpustnost či schopnost interakce [7].

Vzhledem k velkému počtu rozmanitých funkčních skupin disponují HL mnoha reaktivními místy, a proto jsou tyto látky schopné vázat nejrozličnější organické i anorganické látky. Stanovení charakteru vazeb HL s jinými sloučeninami je neustále předmětem zkoumání. Z doposud zjištěných poznatků lze odvodit, že na interakci HL s cizorodými látkami se mohou podílet různé druhy vazeb (iontové, koordinační, kovalentní, aj.) [8].



Obr. 2: Návrh struktury huminových kyselin dle Stevensona [9]



Obr. 3: Strukturní model huminových kyselin dle Steelinka [10]

3.2.5 Modifikace

Díky labilitě a nepoddajnosti huminové makromolekuly je objasnění struktury HL pomocí obvyklých technik organické chemie náročné. Částečné usnadnění studia struktury představuje konverze přírodních HL na stabilní deriváty [11]. Tyto deriváty mají selektivně blokované konkrétní funkční skupiny, čehož se hojně využívá při zkoumání kyselých vlastností nebo vlivu těchto funkčních skupin na reaktivitu HL v různých chemických i biologických procesech [12].

Významnými derivatizačními technikami jsou esterifikace karboxylových skupin pomocí methanolu a thionyl chloridu, nebo acetylace fenolových i alkoholových hydroxylů pomocí anhydridu kyseliny octové a kyseliny sírové. Ve studii [13] se metodou esterifikace většina COOH skupin přeměnila na methylestery a byla potvrzena vysoká selektivita, specifita a účinnost této techniky. U acetylace již takové selektivity dosaženo nebylo, derivatizační činidla blokovala kromě hydroxylů částečně i jiné funkční skupiny.

Funkční skupiny v chemických strukturách lze modifikovat využitím nejrozličnějších alkylačních činidel, která se rozdělují do tří skupin dle podmínek reakce – bazická, neutrální a kyselá [14]. Důležitými bazickými alkylačními činidly jsou alkylhalogenidy, které byly ve studii [15] úspěšně použity k rozsáhlé O-alkylaci lignitických HL. Z neutrálních alkylačních činidel je vhodné zmínit diazomethan, který se běžně využívá ke kvantitativní a čisté derivatizaci kyselých funkčních skupin. Toto činidlo je nicméně toxické, vysoce explozivní, karcinogenní a manipulace s ním je tak náročnější [14].

Vhodnou alternativu diazomethanu představuje trimethylsilyl-diazomethan (TMS-DM). Tato látka má v porovnání s diazomethanem nižší toxicitu i výbušnost, její použití je celkově bezpečnější a nákladově efektivnější, přičemž účinek zůstává srovnatelný. TMS-DM je komerčně dostupný a používá se k methylaci karboxylových skupin i fenolů [16]. Klučáková a spol. použili TMS-DM k methylaci HK a zkoumali vliv této modifikace na difúzi. Methylované HK vykazovaly snížený obsah karboxylových skupin, což způsobilo pokles rychlosti difúze měďnatých iontů v gelech, připravených z takto modifikovaných HK [17].

3.2.6 Využití

Huminové látky jsou hojně využívány. Jejich aplikace zahrnuje především oblasti průmyslu, zemědělství, ochrany a zlepšení životního prostředí a biomedicínu. V rámci průmyslu jsou HL používány ve stavebnictví, papírenství, přípravách kůží nebo dřevařství a slouží zejména k obarvení materiálů. Pro ochranu a zlepšení životního prostředí jsou HL významné díky své struktuře, neboť mohou vázat toxické kovy, pesticidy a jiné polutanty a tím je odstraňovat z přírodních zdrojů. V zemědělství se HL používají ke zlepšení kvality a produktivity půdy, či jako krmivo nebo aditivum hnojiv [18]. Významný je i vliv těchto látek na život rostlin. HL ovlivňují růst a vývoj rostlin, podporují příjem potřebných živin, vykazují účinky na primární i sekundární rostlinný metabolismus a pomáhají ve stresových podmínkách, jako jsou např. sucho, zasolení nebo účinek toxických kovů [19].

Unikátnost huminových látek ukazuje i jejich použití v biomedicině. Nejvýraznější medicínskou aplikací HL je balneoterapie zahrnující využití rašeliny k ozdravným účelům.

Tímto druhem terapie se získalo mnoho pozitivních zkušeností, což vedlo k dalšímu zkoumání s cílem najít nové účinky HL a možnosti uplatnění v terapii. Bylo prokázáno, že HL vykazují antivirovou aktivitu (váží se na glykoproteiny, a tím znemožňují vazbu virů k povrchu buněk), mají pozitivní vliv na hemokoagulaci a fibrinolýzu a vykazují protizánětlivé účinky (potlačují exsudaci a proliferaci) [20]. Právě v oblasti zánětlivých onemocnění jsou HL a produkty z nich odvozené dlouhodobě využívány a studovány. Vybrané příklady ukazuje *Tabulka 2*. Protizánětlivé účinky HL předurčují, že jsou tyto látky bezpečnou alternativou v léčbě a prevenci nemocí spojených se zánětem a mohou nahradit riziková nesteroidní protizánětlivá léčiva [21]. Potenciál HL je i v medicíně veterinární, kde byly tyto látky úspěšně aplikovány jako léčiva a antidota při intoxikaci.

Všechny zjištěné poznatky o účincích HL na kvalitu zdraví jsou jasným předpokladem pro budoucí intenzivní výzkum v této oblasti [20].

Tabulka 2: Příklady preklinických i klinických testů účinků HL [21]

Zdroj/typ HL	Subjekt	Způsob podání	Aplikace
Rašelina	Člověk	Topické, v lázních	Dermatitida, psoriáza, revmatoidní artritida
Sapropel	Krasy	Topické	Hojení ran
	Člověk	Bahenní koupele	Osteoartritida
Humát draselný	Krasy	Orální	Hypersenzitivita, otoky
	Člověk	Orální	Alergická rýma
FK	Myši	Topické	Zánět

3.3 Principy využitých experimentálních technik

3.3.1 Fluorescence

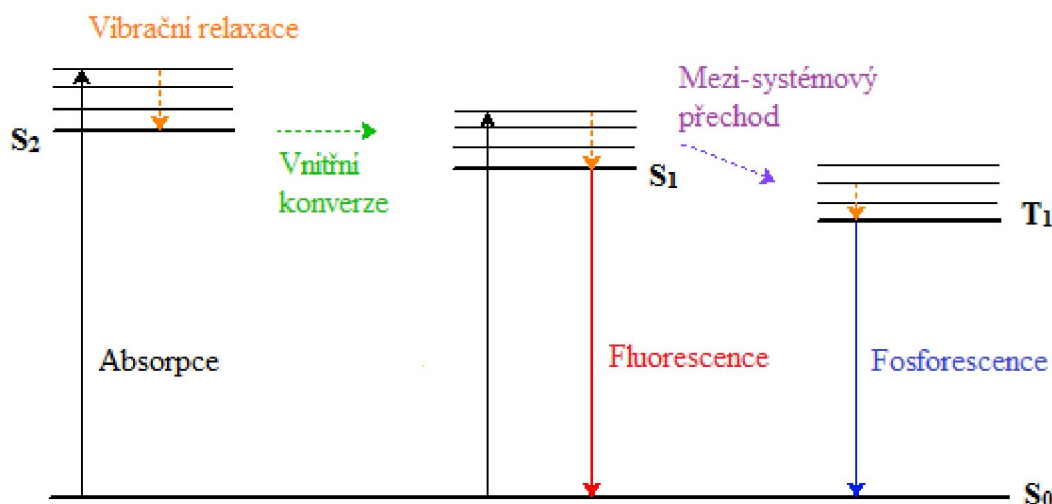
Fluorescenční techniky jsou široce využívány v oblasti studia molekulárních interakcí v rozličných systémech. Z tohoto důvodu byly techniky založené na pozorování fluorescence navrženy jako vhodný prostředek pro studium interakcí, kterými se zabývá tato diplomová práce.

3.3.1.1 Princip

Fluorescence je fotoluminiscenční jev, během kterého dochází k excitaci hmoty světelnou energií a při následné deexcitaci je pozorována emise záření touto hmotou. Za fluorescenci je zodpovědná látka označovaná pojmem fluorofor. Díky fluoroforům dochází k absorpci záření určité vlnové délky a následné emisi záření odlišné vlnové délky. Množství a vlnová délka emitované energie se liší v závislosti na typu a okolí daného fluoroforu [22]. Děje probíhající

při absorpci a následné emisi světelné energie jsou nejčastěji popisovány pomocí Jabloňského diagramu (viz Obr. 4).

Elektron fluoroforu je absorpcí světelné energie excitován ze základního singletového stavu S_0 na jednu z mnoha vyšších vibračních hladin excitovaných singletových stavů (S_1 , S_2 , ..., S_n). Elektron následně ztrácí energii nezářivými přechody (vibrační relaxací nebo vnitřní konverzí) a vrací se na nejnižší vibrační hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Odtud poté elektron přechází zpět na základní stav S_0 za současné spontánní emise fluorescenčního záření [22]. Tento přechod probíhá velmi rychle a fluorescence má tedy tzv. krátký dosvit. Pokud elektron přejde z excitovaného singletového stavu S_1 do tripletového stavu T_1 a až z něj zářivým přechodem zpět do základního stavu S_0 , pak je pozorován fotoluminiscenční jev označovaný jako fosforescence. Absorbovaná energie je v tomto případě vyzářena ve formě fotonu až po nezářivém mezi-systémovém přechodu z S_1 na T_1 , při kterém dochází k obratu spinu elektronu. Proto fosforescence trvá déle (oproti fluorescenci) a má tzv. dlouhý dosvit.

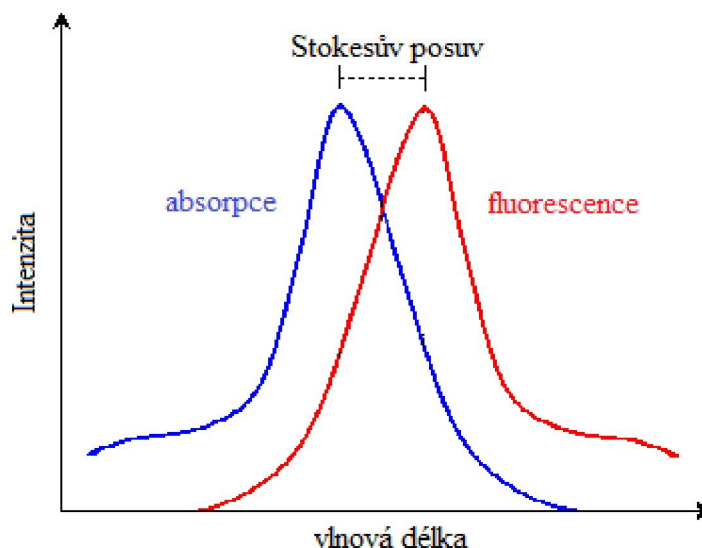


Obr. 4: Zjednodušený Jabloňského diagram [22]

Výsledky z měření fluorescenčního záření, získané pomocí spektrofluorometrů, jsou zaznamenány v podobě emisních spekter. Jedná se o závislost intenzity emitovaného záření na vlnové délce, přičemž vlnová délka excitačního záření zůstává konstantní. Emisní spektrum znázorňuje rozložení pravděpodobnosti různých přechodů z nejnižší vibrační hladiny excitovaného singletového stavu S_1 na vibrační hladiny základního singletového stavu S_0 . Pro danou sloučeninu bývá emisní spektrum její charakteristickou vlastností [23].

U mnoha organických molekul je pozorována zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. Tento jev je způsoben stejnou relativní pravděpodobností absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktury základního a excitovaného stavu jsou shodné. Po absorpci dojde k přechodu elektronu z rovnovážné vibrační hladiny základního stavu S_0 na vyšší vibrační hladiny excitovaného stavu S_1 . Elektron poté rychle přechází vibrační relaxací na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 a odtud následuje zářivý přechod zpět na základní stav S_0 . Výjimky z pravidla

zrcadlové symetrie jsou důsledkem odlišného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném a základním stavu. Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se označuje jako Stokesův posuv (viz Obr. 5). Posunutí maxima emise k vyšším vlnovým délkám je způsobeno ztrátou energie nezářivými přechody při přesunu z vyšších vibračních hladin na nižší [24].



Obr. 5: Zrcadlová symetrie a Stokesův posuv [24]

3.3.1.2 Vnitřní filtrační efekt

Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci fluoroforu pouze v určitém rozsahu optických hustot. V případě vyšší koncentrace fluoroforu dochází k odchylce od lineární závislosti díky vnitřnímu filtračnímu efektu. Tento jev může snižovat intenzitu excitačního i emisního záření zpětnou absorpcí světla [25].

Díky vlivu vnitřního filtračního efektu je tedy nutné experimentálně zjištěná emisní spektra korigovat. Ke korekci lze použít vztah dle Lakowicze [25], který je definován následovně:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot 10^{\left(\frac{OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}}}{2}\right)}, \quad (1)$$

kde F_{corr} je korigovaná hodnota naměřené intenzity fluorescence, F_{obs} je naměřená intenzita fluorescence, OD_{ex} je optická hustota při excitační vlnové délce a OD_{em} je optická hustota při emisní vlnové délce. Pokud je optická dráha studovaného vzorku (tloušťka kyvety používaná při analýze) rovna 1 cm, je možné nahradit optické hustoty za absorbance a korekční vztah znázorněný v rovnici (1) tak přechází na tvar:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \cdot 10^{\left(\frac{A_{\text{ex}} + A_{\text{em}}}{2}\right)}, \quad (2)$$

kde A_{ex} je absorbance při excitační vlnové délce a A_{em} je absorbance při emisní vlnové délce.

3.3.1.3 Zhášení fluorescence

Pojmem zhášení se rozumí pokles intenzity fluorescence důsledkem různých molekulárních interakcí. Látka způsobující tento pokles se nazývá zhášec. Jako zhášec fluorescence funguje velké množství látek, např. molekulární kyslík, cesium, kobalt, nikl, stříbro, aromatické a alifatické aminy, akrylamid, puriny, halogeny, oxid dusnatý, sirouhlík [25] nebo i huminové kyseliny, které jsou předmětem této diplomové práce. Fluorescenční spektroskopie založená na zhášení fluorescence je významným nástrojem pro studium reakcí mezi HK a různými polutanty, a to díky své spolehlivosti, nízké časové náročnosti a relativní jednoduchosti [26].

Z hlediska elektronové úrovně dochází ke zhášení fluorescence třemi hlavními mechanismy, a to mezi-systémovým přechodem, výměnou elektronu mezi donorem a akceptorem nebo fotoindukovaným přenosem elektronu. Tyto mechanismy se vzájemně nevylučují a mnoho studií poukazuje, že zhášení nastává právě jejich kombinací. Z hlediska způsobu kontaktu mezi fluoroforem a zhášecem se rozlišuje zhášení dynamické nebo statické. Jejich principy budou přiblíženy v následujících odstavcích.

Při dynamickém (kolizním) zhášení dochází k difuznímu setkání fluoroforu se zhášecem. Po tomto kontaktu se excitovaný fluorofor vrací do základního energetického stavu bez emise fotonu. Nedochází tedy k žádné chemické změně molekul a fluorofor uvolní absorbovanou energii nezářivě. Stern-Volmerova rovnice, popisující pokles intenzity fluorescence, má v tomto případě tvar:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q], \quad (3)$$

kde F_0 a F jsou intenzity fluorescence bez, respektive se zhášecem, k_q je bimolekulární zhášecí konstanta, τ_0 je doba života fluorescence za nepřítomnosti zhášeče, $[Q]$ představuje koncentraci zhášeče a K_D je Stern-Volmerova zhášecí konstanta, která napovídá o citlivosti fluoroforu ke zhášeci. Čím větší je hodnota této konstanty, tím je větší pravděpodobnost difuzního kontaktu.

Při statickém zhášení dochází ke vzniku vazby mezi fluoroforem a zhášecem a tvoří se nefluorescenční komplex. Pokud tento komplex absorbuje světelnou energii, vrací se ihned zpět do základního energetického stavu bez emise fotonu. Hlavním rozdílem oproti dynamickému zhášení je tedy interakce a vznik vazby mezi komponentami. Stern-Volmerova zhášecí konstanta K_D je v tomto případě nahrazena asociační konstantou vzniku komplexu (K_S) a rovnice (3) tak přechází na tvar:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S \cdot [Q]. \quad (4)$$

V určitých případech může docházet k poklesu intenzity fluorescence smíšeným mechanismem. Fluorofor může být zhášen stejným zhášecem dynamicky i staticky. V této situaci již není závislost poměru intenzit na koncentraci zhášeče lineární, nýbrž konkávně zakřivená směrem k ose y. Stern-Volmerova rovnice je poté zapisována ve tvaru, který je znázorněn v rovnici (5):

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]). \quad (5)$$

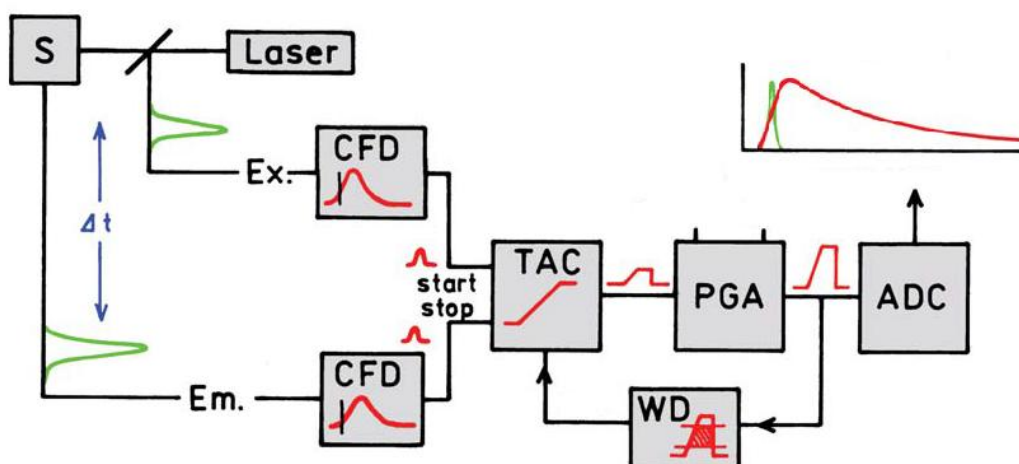
Data získaná ze zhášecích experimentů jsou prezentována obvykle jako závislost poměru intenzit fluorescence (bez zhášedce a v jeho přítomnosti) ke koncentraci zhášedce. Výsledná závislost dat nicméně neprozradí, o jaký charakter zhášení se jedná, neboť jak dynamické, tak i statické zhášení vede k lineárnímu trendu. Rozlišení typu zhášení lze provést změřením závislosti na teplotě, viskozitě nebo zjištěním doby života fluorescence. Právě měření doby života je preferovanou technikou k určení charakteru zhášení. U dynamického zhášení dochází nejen k poklesu intenzity fluorescence, ale stejný klesající trend vykazuje i doba života. Důvodem je depopulace excitovaných energetických stavů bez emise fotonu. U statického zhášení zůstává i přes klesající intenzitu doba života konstantní, protože pozorovaná emise pochází od fluoroforů, které se nestávají součástí komplexu se zhášedcem, a jejich doba života je tedy neměnná [25].

3.3.1.4 Fluorescenční spektroskopie

Díky vysoké citlivosti, selektivitě a možnosti časového rozlišení jsou analytické techniky na bázi studia fluorescence velmi oblíbené. Fluoreskující látku lze měřit přímou fluorimetrickou detekcí, při které přístroj pracuje v rozsahu příslušných vlnových délek excitace a emise. V případě, že analyt není fluorescentní, se využívá nepřímých metod (např. derivatizace, tvorba fluorescenčního komplexu nebo zhášení) [23].

Fluorescenční měření lze rozdělit na dva základní typy. Prvním a nejčastěji využívaným typem je tzv. ustálená (steady-state) fluorescence, která je realizována při konstantním osvětlování a pozorování. Vzorek je v tomto případě ozářen souvislým paprskem světla a následně je zaznamenáno emisní spektrum.

Druhým typem fluorescenčního měření je tzv. časově rozlišená (time-resolved) fluorescence, využívaná ke studiu poklesů intenzity fluorescence nebo anizotropie. V současné době se většina časově rozlišených měření realizuje metodou TCSPC (Time-Correlated-Single-Photon-Counting), tedy časově korelovaným sčítáním fotonů. Princip této metody je znázorněn na *Obr. 6*. Excitační pulz excituje vzorek (S) a signál následně pokračuje prvním kanálem k diskriminátoru konstantní funkce (CFD), který změří příchozí čas pulzu. Následně signál pokračuje na převodník (TAC), ve kterém se začne generovat napětí lineárně rostoucí s časem. V druhém kanálu je dalším diskriminátorem (CFD) změřen příchozí čas pulzu emitovaného fotonu. Odtud signál přechází na převodník (TAC), čímž se zastaví nárůst napětí. V této chvíli je napětí úměrné časovému zpoždění mezi excitačním a emisním signálem. Napětí lze zesílit pomocí zesilovače (PGA) a převést do číselných hodnot pomocí digitálního převodníku (ADC). Výsledná data jsou prezentována v podobě závislosti znázorňující pokles počtu fotonů za čas [25].



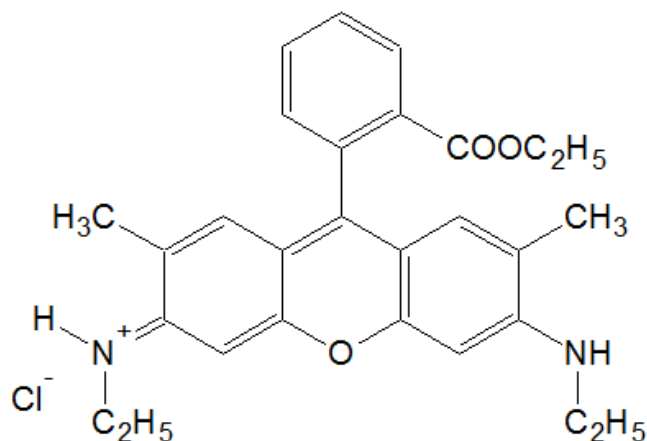
Obr. 6: Schéma TCSPC: princip techniky je popsán v textu [25]

3.3.1.5 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G, též označovaný jako Rhodamin 590 [27], patří do skupiny xanthenových barviv. Jsou to látky s komplexními molekulami, obsahující kruhové struktury a mající planární a rigidní charakter. Struktura Rhodaminu 6G je znázorněna na Obr. 7.

Toto barvivo se vyznačuje dobrou fotostabilitou [28] a vysokým kvantovým výtěžkem fluorescence. Vlnová délka absorpčního maxima je kolem 530 nm, emisní maximum se pohybuje kolem 550 nm. Rhodamin 6G se kompletně rozpouští na monomery v methanolu, ethanolu a dalších organických rozpouštědlech, zatímco ve vodných roztocích má tendenci agregovat z důvodu hydrofobních interakcí mezi alkylovými substituenty [29].

Využívá se hojně jako fluorescenční sonda v biochemii, k monitoringu membránové fúze, k mikroskopickým studiím buněčných procesů a struktur, k analýze proteinů a je to velmi důležité laserové barvivo [30]. V rámci rhodaminových barviv se neustále připravují nové, chemicky modifikované molekuly dle aktuálních potřeb a mnoho takto upravených barviv je již komerčně dostupných [31].



Obr. 7: Struktura rhodaminu 6G

3.3.2 Dialýza

Dialýza představuje všeobecně známou techniku využívanou v řadě odvětví především k oddělení složek směsi pomocí specifických separačních membrán. Separační mechanismus lze však využít také ke studiu interakce mezi látkami. Proto byla dialýza zvolena k analýze interakcí, kterými se zabývá tato diplomová práce.

Separační membrána je fólie nebo tenká vrstva, která může být permeabilní (danou látku propouští) nebo nepermeabilní (danou látku nepropouští). Těchto vlastností se využívá v separačních technikách, jako jsou např. ultrafiltrace a dialýza, k dělení směsi kapalin a plynů nebo k zahušťování roztoků. Membrány separují na základě následujících mechanismů (či jejich kombinací):

- sítový mechanismus – separace na základě různé velikosti částic,
- mechanismus rozpouštění-difúze – složky mají odlišnou afinitu k membráně a difundují přes ni odlišnou rychlostí,
- elektrochemický mechanismus – separace na základě odlišných interakcí mezi složkami směsi a membránou.

Transport látek přes separační membránu je ovlivněn typem tekutiny, jejími reologickými vlastnostmi, velikostí a tvarem pórů, mezerovitostí vrstvy nebo i interakcemi mezi složkami tekutiny a póry v membráně [32].

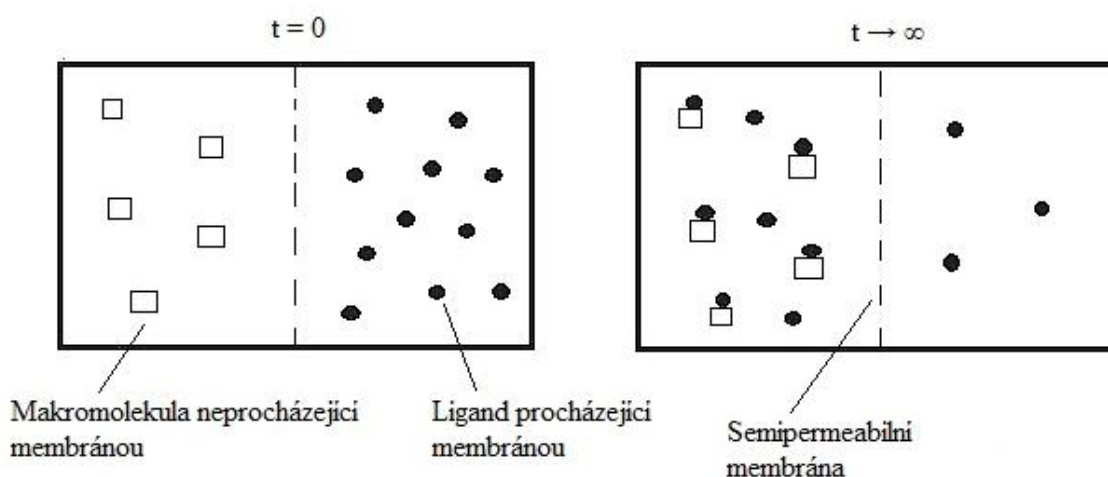
Dialýza je membránová separační technika hojně využívaná v biochemii. Polopropustná membrána, nejčastěji z acetátu celulózy, rozděluje molekuly na základě jejich rozdílné velikosti.

Při nerovnovážné dialýze dochází vlivem koncentračního gradientu k přechodu jedné látky ze směsi přes dialyzační membránu do okolního roztoku. Pro druhou látku ve směsi je membrána nepropustná. V průběhu dialýzy dochází ke snižování koncentrace migrující látky uvnitř dialyzačního vaku a naopak ke zvyšování její koncentrace v okolním roztoku. Ve fázi rovnováhy koncentrační gradient vymizí, protože koncentrace migrující látky je na obou

stranách membrány stejná. Během přechodu látky přes membránu se nevykoná práce a proces může probíhat izotermicky, izobaricky i adiabaticky.

Rovnovážná dialýza je v některých ohledech podobná nerovnovážné dialýze a lze ji využít ke studiu vazby mezi makromolekulami a látkami procházejícími membránou. Při těchto analýzách se obě složky nacházejí na opačných stranách polopropustné membrány (viz Obr. 8). Ligand procházející membránou difunduje na základě koncentračního gradientu přes membránu a váže se na makromolekuly. Po určité době dosáhne systém rovnováhy, při které je koncentrace volného ligandu na obou stranách membrány shodná. Nicméně koncentrace veškerého ligandu na obou stranách membrány stejná není, neboť je část vázána na makromolekuly. Tohoto jevu lze využít ke stanovení rovnovážných či vazebných konstant [33].

Pro studium vazebných interakcí popsanych v předchozím odstavci se jako dvoukomorový systém s možností vložení různých semipermeabilních membrán může využít difúzní cely. Dvě oddělitelné komory difúzní cely se skládají z vnějšího pláště, jenž slouží k udržení izotermických podmínek, a z vnitřního pláště, ve kterém probíhá vlastní experiment. Látka, jejíž difúze přes membránu je sledována, se označuje jako difúzní sonda. Po nalití roztoků do prostoru vymezeném vnitřním pláštěm začne vlivem koncentračního gradientu probíhat samotná difúze, která vede k vyrovnání koncentrace difúzní sondy v obou komorách (na obou stranách membrány). Vlastní experiment je poměrně časově náročný (trvá i několik dní) a rychlost je vždy ovlivněna typem zkoumaného materiálu. Postup difúzního procesu lze sledovat pomocí spektroskopických technik a ze získaných absorbancí vypočítat změnu koncentrace difúzní sondy v komorách difúzní cely [34].



Obr. 8: Studium vazebných interakcí pomocí rovnovážné dialýzy [33]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Vliv funkčních skupin na reaktivitu huminových kyselin

Problematicke posouzení vlivu konkrétních funkčních skupin ve struktuře HK na vazbu s nejrůznějšími látkami je věnována pozornost po celém světě již řadu let.

Guan a spol. [35, 36] sledovali roli funkčních skupin při interakci přírodní organické hmoty (NOM) s hydroxidem hlinitým. Pro studium byly jako vhodný reprezentant NOM vybrány kyselina dihydroxybenzoová a série aromatických karboxylových kyselin s různým počtem a polohou COOH skupin. Tyto látky totiž obsahují reaktivní funkční skupiny typické pro huminové látky, které jsou významnou součástí přírodní organické hmoty. Pomocí infračervené spektroskopie bylo zjištěno, že interakce ovlivnily hodnotu pH i poloha OH a COOH skupin. Fenolové funkční skupiny se na interakci podílely významněji za alkalického pH a s OH skupinami v polohách ortho. Za nízkého pH a s OH skupinami v jiných polohách převažoval vliv karboxylových funkčních skupin. Dále autoři zjistili, že přítomnost více jak tří COOH skupin na jednom benzenovém kruhu interakci limitovalo.

Terkhi a spol. [37] potvrdili účast karboxylových skupin HK na vazbě rtuťnatých iontů. Pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací autoři zaznamenali s rostoucí koncentrací rtuťnatých iontů postupný pokles absorpce vibračních pásů COOH a naopak nárůst vibračních pásů COO⁻.

Při studiu komplexace s izotopem kobaltu ⁶⁰Co byly HK rozděleny na dvě frakce s odlišnou velikostí molekul, strukturou a zastoupením funkčních skupin. Frakce s větší velikostí molekul měla větvenou strukturu a dominantní zastoupení alifatických COOH a OH skupin. Frakce s menší velikostí molekul obsahovala především aromatické COOH a fenolové OH skupiny. Výsledky z FT-IR, ¹³C NMR, acidobazických titračních křivek a rentgenové fotoelektronové spektroskopie ukázaly, že se ⁶⁰Co přednostně vázal kovalentní vazbou na frakci s menší velikostí molekul. Komplexace s frakcí o větší velikosti molekul byla založena jen na slabé elektrostatické přitažlivosti a ovlivněna sterickým bráněním [38].

Pro porovnání vlivu karboxylových i fenolových funkčních skupin byla zkoumána interakce uranylových iontů s přírodními a modifikovanými HK za kyselého pH. Modifikace zahrnovala selektivní blokaci fenolových OH skupin. Výsledky z FT-IR a rentgenové absorpční spektroskopie ukázaly, že blokace výrazně neovlivnila okolí uranylových iontů ve vzniklých komplexech. Fenolové OH skupiny měly tedy za daných podmínek pouze minoritní vliv a na reakci se podílely především karboxylové funkční skupiny [39].

Vliv karboxylových skupin HK byl dále studován interakcí s ionty kadmia. I zde autoři provedli modifikaci, tentokrát však blokaci karboxylových funkčních skupin pomocí methanolu a thionyl chloridu. Z výsledků FT-IR a potenciometrické titrace vyplynulo, že se ionty kadmia preferenčně vázaly na nemodifikované HK a i stabilita byla v případě přírodních HK větší. Karboxylové funkční skupiny se tedy v tomto případě významně podílely na reakci [40].

Působení reaktivních funkčních skupin bylo pozorováno u difuzivity měďnatých iontů v huminových gelech. Modifikací pomocí TMS-DM došlo k methylovaní karboxylových skupin ve struktuře HK. U gelů připravených z methylovaných HK byl zjištěn pokles v hodnotě difúzního koeficientu Cu^{2+} . Difúzní charakteristiky studovaného iontu v huminových hydrogelech byly značně ovlivněné obsahem i disociačním chováním kyselých funkčních skupin a COOH měly mnohem větší význam než ostatní funkční skupiny HK [41].

Role karboxylových skupin byla sledována také při interakci HK s organickými nabitými látkami. V případě tohoto typu reakce vykazovaly původní i modifikované HK (methylované pomocí TMS-DM) překvapivě stejné chování. Karboxylové funkční skupiny přispívaly k celkovému chemickému potenciálu HK mnohem méně a na samotné interakci se nepodílely v takovém rozsahu, jak je obecně přijímáno. Naopak se na vazbě důležitě podílely i jiné funkční skupiny HK [42].

4.2 Interakce huminových kyselin s organickými ionty

Povahu organických iontů vykazuje celá řada látek, které představují významné polutanty životního prostředí. Vazba na HK představuje jednu z možných cest jejich odstranění z přírodních zdrojů. Z tohoto důvodu je vazba mezi HK a iontovými organickými látkami hojně studována.

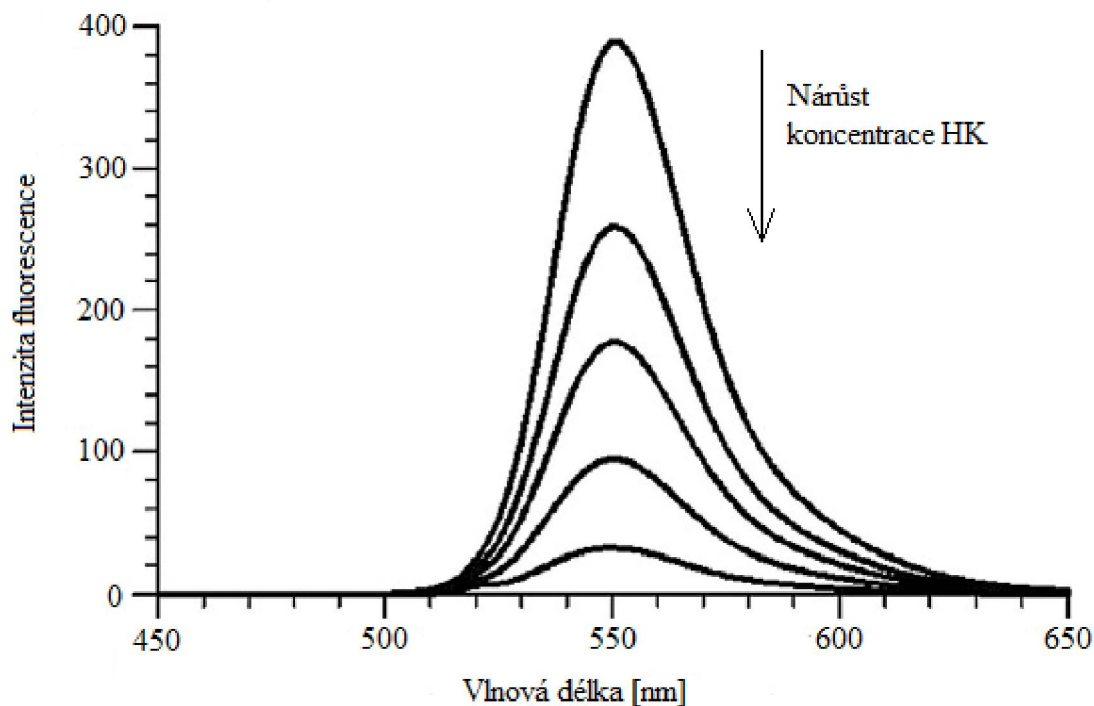
4.2.1 Interakce s barviv

Sheng a spol. [43] sledovali interakci mezi kationovou toluidinovou modří a HK. Výsledky ukázaly, že na pozorovanou reakci měla vliv iontová síla i hodnota pH. S rostoucí iontovou silou se pravděpodobně redukovala tloušťka elektrické dvojvrstvy, čímž se snížila vazebná schopnost HK. Naopak s rostoucím pH vazebná schopnost HK rostla, díky většímu počtu disociovaných funkčních skupin. Jednalo se patrně o fyzikální adsorpci řízenou elektrostatickými interakcemi.

Janoš a spol. [44] zkoumali sorpci vybraných bazických a kyselých barviv na oxyhumolit. S rostoucím pH byla potlačena sorpce kyselých barviv, zatímco sorpce bazických barviv zůstávala v daném rozsahu pH neměnná. Význam pH lze přisoudit disociaci funkčních skupin HL na povrchu sorbentu. Negativní náboj povrchu tak umocnil bránění sorpce kyselých (aniontových) barviv.

Huminové kyseliny významně ovlivnily adsorpci barviva (Basic Yellow 28) na adsorbenty různého původu. Se zvyšující se hodnotou pH docházelo k disociaci funkčních skupin HK, čímž se zvýšil negativní náboj povrchů a zlepšila se adsorpce barviva na tyto povrchy [45]. Podobného pozitivního vlivu HK na adsorpci barviva dosáhli i Zhang a spol., kteří připravili nanočástice oxidu železnato-železitého pokryté huminovými kyselinami. Výsledky ukázaly, že nanočástice s HK na povrchu adsorbovaly mnohem větší množství methylenové modře než samotné HK nebo nanočástice bez huminového povrchu. Hlavním mechanismem adsorpce byly pravděpodobně elektrostatické interakce [46].

Hafuka a spol. [47] použili ke studiu interakce HL a barviv měření fluorescenční intenzity. Konkrétně bylo sledováno zhášení fluorescence fluoresceinu a rhodaminu 6G huminovými látkami. Výsledky ukázaly silné zhášení fluorescence rhodaminu 6G s rostoucí koncentrací HK (viz *Obr. 9*). Mechanismus zhášení byl určen jako statický. Silné zhášení fluorescence rhodaminu pomocí HK bylo pravděpodobně způsobeno elektrostatickou interakcí mezi kationovým barvivem a aniontovými skupinami HK. Účinek HK na zhášení fluorescence aniontového fluoresceinu byl slabý.

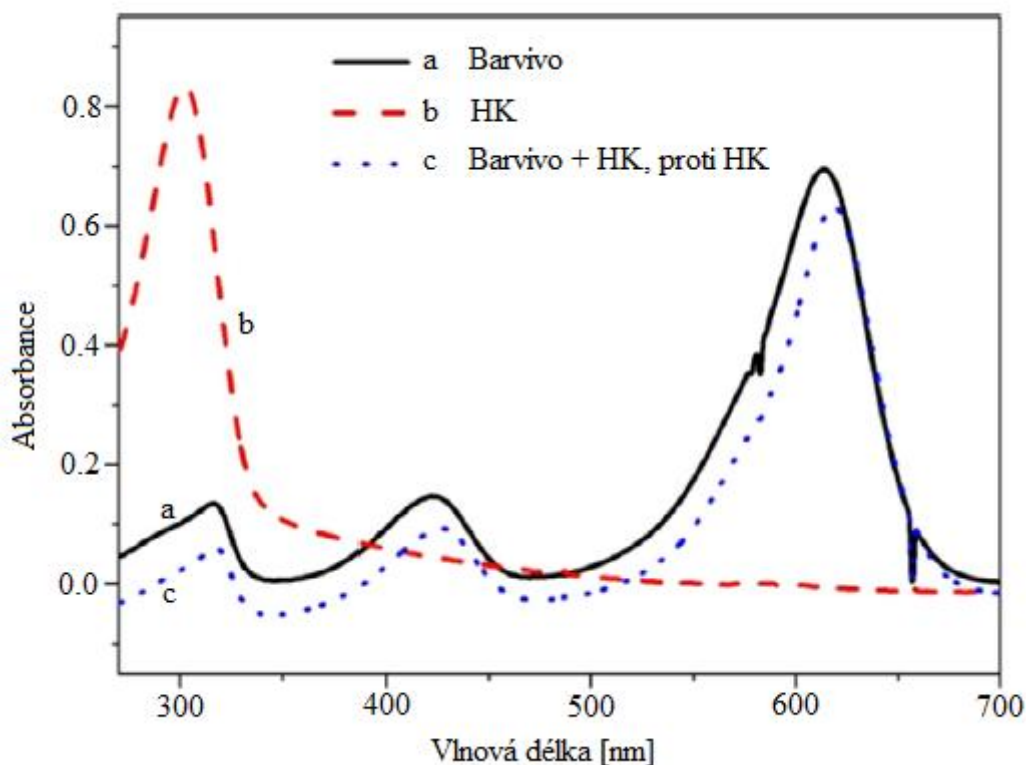


Obr. 9: Fluorescenční spektra rhodaminu 6G s rostoucí koncentrací HK [47]

U interakce HK s opačně nabitými barvivými (methylenovou modří a rhodaminem 6G) bylo zjištěno, že vazba mezi těmito reaktanty zřejmě nebude primárně řízena elektrostatickou přitažlivostí. Z nižšího vlivu karboxylových funkčních skupin HK vyplynulo, že hlavní roli spíše hrají interakce mezi aromatickými složkami ve strukturách obou barviv a huminových kyselin [42].

Minoritnější role elektrostatických interakcí byla potvrzena i při studiu difúze methylenové modře a rhodaminu 6G v hydrogelech s přidavkem HK. Přítomnost HK viditelně snižovala mobilitu barviv, což lze přisoudit specifickým interakcím mezi HK a barvivými. Imobilizační síla HK však klesala s rostoucí hodnotou pH. Z těchto výsledků je patrné, že interakce mezi huminovým podílem a barvivými bude zřejmě komplexnějšího charakteru [48].

Pomocí UV-VIS spektrofotometru byly sledovány změny ve struktuře malachitové zeleně interagující s HK. Ze získaných absorpčních spekter je patrné, že u komplexu barviva s HK (měřeném proti HK) došlo k červenému posuvu a zároveň ke snížení absorbance (viz *Obr. 10*). Tento jev poukazuje na změny v konformaci fenylových kruhů v molekule barviva, a tedy na existenci patrových interakcí (π - π interakce nebo též π - π stacking) mezi aromatickými kruhy HK a fenylovými kruhy malachitové zeleně [49].



Obr. 10: UV-VIS studie vazby HK a malachitové zeleně [49]

Stejného posuvu k větším vlnovým délkám a nižší absorbanci dosáhli i Zanini a spol., kteří sledovali interakci oxazinu s HK. Navázání barviva na HK narušilo symetrii delokalizovaného systému π vazeb ve struktuře oxazinu. Díky vlivu pH, iontové síly a zjištěným změnám ve struktuře barviva se došlo k předpokladu, že se na vazbě reaktantů podílí jak reakce negativních skupin HK s kationovým barvivem, tak dominantně i interakce hydrofobních regionů HK a oxazinu [50].

4.2.2 Interakce s biocidy

Již Hayes se ve své studii zabýval interakcí půdní organické hmoty s triazinovými herbicidy. Ze získaných poznatků autor vyhodnotil, že v adsorpci triazinů na půdní organickou hmotu mohou být zapojené Van der Waalsovy síly, vodíkové vazby nebo iontová výměna. Diskutován byl i možný příspěvek chemisorpce, výměny ligandů či donor-akceptorové vazby. Mechanismus adsorpce ovlivnila kompozice a saturace HK vodíkem a kovovými ionty [51].

Gevao a spol. [52] potvrdili různorodou povahu vazby mezi pesticidy a půdou. Bipyridyly se vázaly pomocí iontové výměny (zahrnují karboxylové i fenolové OH skupiny HK) nebo pomocí Van der Waalsových sil či donor-akceptorové vazby. Triazinové látky tvořily iontovou vazbu nebo vodíkovou vazbu v rámci aminoskupin. Dalším možným mechanismem byla výměna ligandů nebo i hydrofobní síly.

Z výsledků zkoumání interakce půdních HK s paraquatem vyplynuly dva možné mechanismy interakce mezi těmito reaktanty. Jednalo se o iontovou vazbu a vazbu mezi

donorem a akceptorem elektronu u π - π interakcí aromatických kruhů. Velký vliv na sledovanou reakci mělo chemické složení a zdroj HK [53].

Také při studiu interakcí skupiny triazinových a bipyridylových herbicidů s HK se pomocí FT-IR spektroskopie ukázalo, že v adsorpčním procesu může figurovat více vazebných mechanismů. U triazinů byla pozorována iontová vazba mezi COOH skupinami HK a protonovanými dusíky herbicidů, nebo také vazba vodíková mezi kyslíkatými skupinami HK a aminoskupinami či heterocyklickými dusíky herbicidů. U bipyridylů ukázaly výsledky tvorbu iontové vazby mezi COO⁻ skupinami HK a kladným nábojem obou herbicidů a dále tvorbu π - π vazeb mezi akceptory a donory elektronů [54].

Dusíky ve struktuře metribuzinu hrály významnou roli při adsorpci tohoto triazinového herbicidu na HK z různých zdrojů. Zvýšení intenzity příslušných pásů v infračervených spektrech indikovalo tvorbu aminů a amidů vznikajících z interakce karboxylových a alkoholových skupin HK s aminoskupinami metribuzinu [55].

Iglesias a spol. [56] sledovali interakci biocidů paraquatu a kyseliny (4-chlor-2-methylfenoxy)octové (MCPA) s HK se zaměřením na vliv pH a iontové síly. Kationtový paraquat reagoval s kyselými funkčními skupinami HK a docházelo k výměnnému kationtovému mechanismu. Množství navázaného paraquatu rostlo s rostoucím pH a klesalo s rostoucí iontovou silou. U MCPA byla pozorována mnohem menší ochota vazby, protože tato látka vykazovala aniontovou formu. Za hlavní vazebný mechanismus se tedy považovaly elektrostatické síly. Nicméně při nízkém pH, kdy byly HK málo ionizované, převažovaly v interakci Van der Waalsovy síly a vodíkové vazby.

Iglesias a spol. také porovnávali adsorpci MCPA a paraquatu na minerál goethit, který měl povrch tvořený vrstvou HK. V případě MCPA byla výrazně větší adsorpce na samotný minerál než na minerál s vrstvou HK. Tento výsledek nejpravděpodobněji způsobily elektrostatické účinky (HK neváží aniontovou formu MCPA). Vazba HK na goethit snížila počet reaktivních míst pro pesticid na povrchu minerálu, což též mohlo ovlivnit adsorpci [57]. U paraquatu byla naopak výrazně větší adsorpce na goethit s vrstvou HK než na samotný minerál, což lze přisoudit vazbě kationového pesticidu s organickou hmotou. Adsorpce paraquatu na HK tvořící povrch goethitu byla nicméně zřetelně nižší než adsorpce na HK v roztoku. Tento jev lze přisoudit vazbě HK s minerálem, protože tím došlo k poklesu vazebných míst pro paraquat [58].

4.2.3 Interakce s dalšími iontovými organickými látkami

Jung a spol. [59] srovnávali vazbu kationtového cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a neiontového nonylfenylethoxyly (NPE) na přírodní HL. U neiontového surfaktantu nebyla pozorována změna ve fluorescenčních spektrech HL a tedy nedošlo k žádné výrazné interakci mezi NPE a HL. Oproti tomu přítomnost CTAB způsobila viditelné změny ve fluorescenční charakteristice HL, což indikovalo vznik vazby. Hlavní roli v tomto případě hrály elektrostatické interakce. Ze získaných výsledků však nelze vyloučit ani příspěvek hydrofobních sil.

Fluorescenční spektroskopie byla použita také při studiu interakce derivátů pyrenu s HK. Vybrané deriváty měly povahu neutrální, kationtovou i aniontovou. Autoři porovnávali vazebné konstanty získané pomocí ustálených fluorescenčních zhášecích technik. Výsledky ukázaly silný vliv elektrostatických sil, neboť výrazně největší hodnotu vazebné konstanty vykazoval kationtový derivát pyrenu a naopak nejnižší hodnotu měl aniontový derivát. Vliv elektrostatických sil na vazbu byl potvrzen i solným efektem. Získaná fluorescenční spektra také ukázala, že HK fungují jako efektivní zhášec fluorescence pyrenových derivátů [60].

Rovněž u komplexace s polycyklickými aromatickými sloučeninami vystupovaly HK jako zhášec fluorescence. Z výsledků studia doby života a anizotropie vyplynul statický mechanismus zhášení fluorescence kationtového quinolinu v přítomnosti HK. Sorpce quinolinu na HK byla řízena pravděpodobně iontovou výměnou, díky vlivu pH a iontové síly [61].

Maszkowska a spol. [62] sledovali odlišnosti v adsorpci ionizovatelných farmaceutik na půdu v závislosti na jejich iontové formě. Sorpce kationtového propranololu byla exotermní, spontánní, entalpicky řízená a významnější za nižších teplot. Na mechanismu interakce mezi tímto léčivem a půdní složkou se kromě iontové výměny patrně podílely i vodíkové vazby. Sorpce aniontového sulfisoxazolu byla endotermní, entropicky řízená, spontánní pouze za vyšších teplot a výrazně nižší oproti sorpci propranololu. Mechanismus interakce byl v tomto případě složitým procesem s možným vlivem vodíkových nebo donor-akceptorových vazeb.

Guo a spol. [63] zkoumali sorpci ionizovatelných antimikrobiálních látek na HK za různých podmínek pH a iontové síly. Autoři pozorovali pokles sorpce s rostoucím pH a rostoucí iontovou silou. Ze získaných informací vyplynulo, že vedle iontové výměny v interakci participovaly také vodíkové vazby a π - π interakce donoru a akceptoru elektronu. FT-IR a NMR dále ukázaly, že s antimikrobiálními látkami interagovaly převážně karboxylové skupiny a o-alkylové struktury HK.

Interakce antimikrobiální látky (norfloxacin) s HK za různých podmínek (pH, iontová síla, teplota) byla předmětem zájmu i ve studii [64]. Maximální sorpce se dosáhlo za mírně kyselých podmínek, při kterých měl norfloxacin povahu kationtu. Z toho plyne, že dominantním procesem v interakci byla iontová výměna probíhající mezi piperazinylovou částí norfloxacinu a negativními skupinami HK. Karbonylové skupiny a aromatické struktury HK mohly též interagovat s antimikrobiální látkou přes vodíkovou vazbu a hydrofobní efekt.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie a spotřební materiál

Hydroxid sodný (pecky, Penta; mikroperly, Lach-Ner s. r. o.)

Pyrofosfát sodný, bezvodý (Sigma-Aldrich Co.)

Kyselina chlorovodíková 35% (Penta)

Dusičnan stříbrný (Lachema n. p. Brno)

Kyselina fluorovodíková 38–40% (Penta)

Methanol p. a. (Lach-Ner s. r. o.)

Chloroform p. a. (Lach-Ner s. r. o.)

Trimethylsilyl-diazomethan v hexanu, 2M (Acros)

Voda čištěná přístrojem PURELAB-flex

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner s. r. o.)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner s. r. o.)

Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich Co.)

Silikonová pasta Lukosan (Lučební závody a. s., Kolín)

Dialyzační membrána Spectra/Por[®] (Spectrum laboratories, Inc.)

- Plošná šířka: 54 mm
- Průměr: 34 mm
- Objem/délka: 9,3 ml/cm
- Délka: 15 m
- MWCO: 3,500

5.2 Použité přístroje

Centrifuga Rotina 46R Hettich

Multimetr Mettler-Toledo SevenMulti (kombinovaný pH a konduktometr)

Lyofilizátor Virtis benchtop K (Bio Trade s. r. o)

Spektrofotometr UV-VIS HITACHI U-3900H

Difúzní cely Perme Gear, Inc.

Luminiscenční spektrometr Aminco-Bowman[®] Series2, Thermo Spectronic

Spektrofluorometr Fluorocube, Horiba Jobin Yvon Scientific, Inc.

5.3 Izolace a úprava vzorků huminových kyselin

5.3.1 Extrakce z lignitu

Navážka 30 g výchozího zdroje HK (pomletý lignit) byla smísena s 1 dm³ 0,1M roztoku HCl a tato směs byla dekalcirována 1 hodinu na třepačce. Lignit byl následně promýván dostatečným množstvím destilované vody do té doby, dokud již nevykazoval přítomnost chloridových iontů (zkouška pomocí AgNO₃). Takto předupravený lignit byl smísen s 2 dm³ extrakčního roztoku (0,1M hydroxid sodný a 0,1M bezvodý pyrofosfát sodný) a nádoba s touto směsí byla ponechána na třepačce přes noc.

Suspenze lignitu a extrakčního roztoku byla po noci na třepačce odstředěna, kapalný podíl (roztok huminových a fulvinových kyselin) byl přefiltrován přes filtr a získaný filtrát byl okyselen pomocí HCl na hodnotu pH < 2. Po 2 hodinách došlo k viditelnému vysrážení HK a následovala centrifugace k oddělení vysrážených HK. Získané HK (z centrifugace v podobě sedimentu) byly smíseny s 1 dm³ 0,5 % obj. roztoku směsi HCl a HF a tato směs byla umístěna na třepačku na 2 dny.

Po dvou dnech byla suspenze odstředěna a získaný sediment byl převeden do připravených dialyzačních stěr a dialyzován proti destilované vodě do vymytí chloridových iontů (zkouška pomocí AgNO₃). HK bez chloridových iontů byly podrobeny lyofilizaci.

Celý proces extrakce byl několikrát opakován vždy s novou navážkou 30 g lignitu, z důvodu potřeby většího množství HK pro následné experimenty s modelovým iontem. Celkově bylo extrakcí získáno 55,1 g HK.

5.3.2 Selektivní methylace

Část extrahovaných HK (16 g) byla podrobena selektivní methylaci. Důvodem bylo porovnání a studium vlivu této modifikace na interakce s modelovým iontem.

Do osmi kádínek bylo naváženo vždy po 2 g extrahovaných HK a ke každé navážce bylo pipetováno 8 cm³ chloroformu a 4 cm³ methanolu. Následně bylo do každé kádinky pomalu po kapkách přidáno 8 cm³ trimethylsilyl-diazomethanu v hexanu (TMS-DM). Směsi byly míchány 2 hodiny na magnetické míchačce v digestoři a poté bylo ke každé přidáno dalších 1,5 cm³ TMS-DM. Methylované HK (mHK) se nejprve sušily v digestoři při laboratorní teplotě přes noc a poté byly přemístěny na Petriho misky a sušeny v sušárně při 40 °C. Sušení probíhalo do té doby, dokud se z mHK neodpařilo nezreagované methylační činidlo.

Touto modifikací došlo k esterifikaci karboxylových skupin ve struktuře HK, a tedy ke snížení obsahu možných vazebných míst, zodpovědných především za případné elektrostatické interakce. Rozdíl mezi mHK a nemodifikovanými HK byl ale patrný již na první pohled, což ukazuje *Obr. 11*.



Obr. 11: Vizuální rozdíl mezi mHK (vlevo) a nemodifikovanými HK (vpravo)

5.4 Charakterizace huminových vzorků

K charakterizaci vlastních izolovaných a methylovaných vzorků HK byla použita elementární analýza, termogravimetrická analýza (TGA), FT-IR spektroskopie metodami ATR a DRIFTS a velikostně vylučovací chromatografie s detekcí pomocí víceúhlového rozptylu světla (SEC-MALS).

Elementární analýza obou vzorků huminových kyselin byla provedena na analyzátoru EA3000 (EuroVector) a termogravimetrická analýza na přístroji TGA Q5000 (TA Instruments) při rychlosti ohřevu $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ v atmosféře O_2 a N_2 . Infračervená spektra byla získána pomocí FT-IR spektrometru Nicolet iS50 metodou ATR na jednodrazovém diamantovém krystalu a metodou DRIFTS s DRIFTS nástavcem SpectraTech model 0002–395. Spektra byla stanovena s rozlišením 8 cm^{-1} jako průměr 64 skenů.

Pro SEC-MALS charakterizaci byly připraveny roztoky obou typů huminových kyselin o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním navážky HK nebo mHK v NaOH a následným ředěním fosfátovým pufrům o pH 6,9 a síle 10 mM . Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním příslušných navážek $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$ v čištěné vodě. Vzorky byly před samotným měřením vždy přefiltrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$. K analýze byl využit SEC-MALS systém s chromatografickou částí (Agilent Technologies) a detektorovou částí (Wyatt Technology). Pro chromatografickou separaci byla použita kolona BioSep-SEC-S2000 o rozměrech $600 \times 7,8\text{ mm}$ s ochrannou předkolonou BioSep-SEC-GUARD-s2000 o rozměrech $35 \times 7,8\text{ mm}$ (obě Phenomenex). Mobilní fáze byl $0,1\text{ M}$ fosfátový pufr o $\text{pH} \approx 7$ s přídavkem NaN_3 a objem nástřiku byl nastaven na $100\text{ }\mu\text{l}$. Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru Astra 6.1. Molekulová hmotnost byla stanovena výpočtem ze signálu z UV-VIS detektoru metodou kalibrační křivky pomocí programu Origin (OriginLab, verze softwaru 7.5853). Kalibrační křivka pro UV-VIS detektor byla získána měřením vzorků polystyrenových standardů (střední molekulové hmotnosti použitých standardů $\text{MW} = 1\,530, 16\,000, 34\,700, 57\,500, 70\,000$ a $505\,100\text{ Da}$).

5.5 Fluorescenční experimenty

5.5.1 Příprava vzorků

Hodnoty koncentrací připravovaných vzorků byly převzaty ze studie [47], ve které sledovali zhášení rhodaminu 6G huminovými kyselinami izolovanými z vodního zdroje.

Pro vlastní experimenty byl připraven zásobní roztok izolovaných HK o koncentraci 0,1 g/l rozpuštěním příslušné navážky v 0,01M NaOH. Stejně bylo postupováno i v případě mHK. Zásobní roztok barviva o koncentraci 330 μM byl připraven rozpuštěním navážky v čištěné vodě a ředěním. Měřené vzorky byly doplňovány na finální objem fosfátovým pufrům, jehož příprava je zmiňována v kapitole 5.4.

Pro měření zhášení a dob života fluorescence byla nachystána sada sedmi vzorků. Do odměrných baněk bylo pipetováno vždy 30 μl zásobního roztoku rhodaminu 6G a různý objem zásobního roztoku HK nebo mHK. Finální objem 10 ml byl doplněn fosfátovým pufrům. Sada vzorků s rostoucím přidávaným objemem HK je znázorněna na *Obr. 12*, v jehož popisku jsou zmíněny i výsledné hmotnostní koncentrace HK v jednotlivých vzorcích. Stejná sada byla připravena i v případě mHK.



Obr. 12: Vzorky pro měření zhášení fluorescence: 1 = 0 g/l HK, 2 = 0,000 5 g/l HK, 3 = 0,001 g/l HK, 4 = 0,002 g/l HK, 5 = 0,003 g/l HK, 6 = 0,004 g/l HK, 7 = 0,005 g/l HK

5.5.2 Měření emisních spekter

Vzorky s barvivem a rostoucí koncentrací HK nebo mHK (postup viz kapitola 5.5.1) byly aplikovány do křemenné fluorescenční kyvety a jejich emisní spektra byla měřena pomocí luminiscenčního spektrometru Aminco-Bowman[®]. Nastavení spektrometru bylo následující:

- Vlnová délka excitace: 520 nm
- Očekávané maximum emise: 550 nm
- Šířka štěrby: 4 nm
- Rozsah emisního spektra: 530–650 nm
- Krok: 1 nm

Samotné měření vždy začínalo vzorkem 1, tedy tím, který neobsahoval HK nebo mHK a očekávala se tak u něj největší intenzita emise. U tohoto vzorku byla nastavena hodnota napětí, která následně zůstávala během celého měření stejná i pro ostatní vzorky. Získaná emisní spektra byla exportována jako textové dokumenty. Maxima v emisních spektrech byla využita ke stanovení zhášecích konstant z vhodné Stern-Volmerovy rovnice.

5.5.3 Korekce emisních spekter

Z důvodu možného vlivu vnitřního filtračního efektu (viz kapitola 3.3.1.2) na emisní spektra byla u získaných fluorescenčních dat provedena korekce dle rovnice (2). Ke zjištění požadovaných absorbancí měřených vzorků byl použit UV-VIS spektrofotometr HITACHI U-3900H s nastaveným rozsahem vlnových délek 650–520 nm, krokem 1 nm a šířkou štěrby 4 nm. Získaná absorpční spektra byla exportována v podobě dokumentů MS Excel.

5.5.4 Měření doby života fluorescence

Pro stanovení mechanismu zhášení fluorescence rhodaminu 6G huminovými kyselinami byly vzorky (příprava viz kapitola 5.5.1) podrobeny analýze časově rozlišené fluorescence pomocí přístroje Fluorocube, který pracuje na principu metody TCSPC. Nastavení spektrofluorometru Fluorocube bylo následující:

- Excitační vlnová délka nanoLED diody: 455 nm
- Šířka pulzu diody: 1,2 ns
- Emisní monochromátor: 550 nm
- Excitační polarizátor: 0°
- Emisní polarizátor: 54,7°
- Coaxial delay: 65 ns
- TAC range: 50 ns
- RT preset: 0 s
- Peak preset: 10 000 counts
- Repetition rate: 1 MHz
- Sync delay: 0 ns

Signál diody (tzv. prompt) byl stanoven použitím koloidního křemíku (ludox) při nastavení emisního monochromátoru na excitační vlnovou délku zvolené nanoLED diody, tj. 455 nm.

Poklesy intenzit fluorescence u měřených vzorků byly zaznamenávány pomocí programu DataStation Version 2.4. K získání dob života fluorescence rhodaminu 6G z naměřených dat byl použit program DAS6 Fluorescence Decay Analysis, který pracuje na principu nelineární regrese metodou nejmenších čtverců. V tomto programu byla naměřená data prokládána 1–2 exponenciální matematickou funkcí. Výsledná data obsahující hodnoty dob života fluorescence rhodaminu 6G v přítomnosti rostoucí koncentrace HK/mHK byla exportována v podobě textových dokumentů.

5.6 Dialyzační experimenty

Princip dialyzačních experimentů navazoval na studium dialýzy v difuzních celách v bakalářské práci autorky [65], kde reaktanty byly HK/mHK a methylenová modř. V případě této diplomové práce byly jako reaktanty zvoleny nově extrahované a methylované HK/mHK a rhodamin 6G.

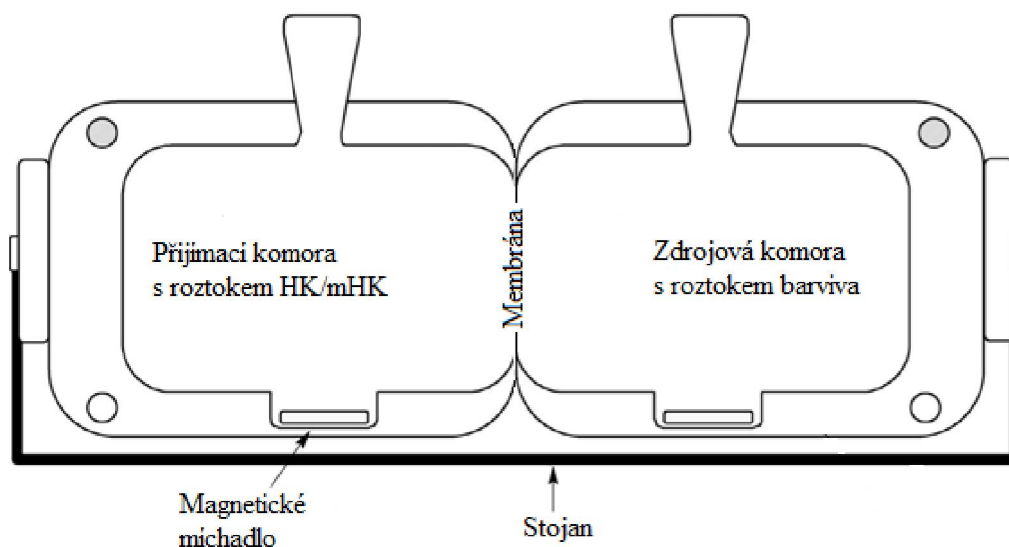
5.6.1 Postup měření

Pro přípravu vzorků na dialýzu v difuzních celách byl chystán zásobní roztok HK/mHK o koncentraci 1 g/l rozpuštěním navážky v 0,01M NaOH. Zásobní roztok rhodaminu 6G o koncentraci 1 g/l byl připraven rozpuštěním navážky v čištěné vodě. Příslušné zásobní roztoky byly ředěny na požadované koncentrace fosfátovým pufrům, jehož příprava je zmiňována v kapitole 5.4.

Schematické znázornění dialyzačních experimentů ukazuje *Obr. 13*. Mezi komory difuzní cely (výrobce Perme Gear, Inc.) byla umístována dvojité dialyzační membrána (Spectra/Por[®]). Komory byly fixovány silikonovou pastou Lukosan a celá difuzní cela byla umístěna do stojanu, který obě komory tlačil k sobě. Následně bylo do zdrojové i přijímací komory zároveň nalito 60 ml příslušných studovaných roztoků a horní otvory byly uzavřeny zátkami. Takto připravená aparatura byla umístěna na magnetickou míchačku, aby roztoky v komorách byly pomocí míchadel po celou dobu experimentu promíchávány. V průběhu experimentu byl každý den odebírán roztok barviva ze zdrojové komory do křemenné kyvety SUPRASIL[®] a byla měřena absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H. Nastavení spektrofotometru bylo následující:

- Rozsah: 900–200 nm
- Rychlost: 300 nm/min
- Změna lamp při: 340 nm
- Šířka štěrby: 4 nm
- Krok: 1 nm
- Výstupní zpráva: MS Excel

Aby mohly být získané absorbance využity k pozorování změny koncentrace barviva ve zdrojové cele, byla připravena kalibrační řada roztoků barviva o koncentracích 0,000 1 g/l; 0,000 25 g/l; 0,000 5 g/l; 0,001 g/l; 0,002 5 g/l a 0,005 g/l. Příprava těchto roztoků byla založena na ředění zásobního roztoku rhodaminu 6G (1 g/l) fosfátovým pufrům. Kalibrační řada byla změřena na UV-VIS spektrofotometru HITACHI U-3900H při stejném nastavení jako pro dialyzační experimenty.



Obr. 13: Schéma dialýzy v difuzních celách, převzato z [66], upraveno

5.7 Diferenční UV-VIS

Strukturní změny rhodaminu 6G po vazbě s HK nebo mHK byly studovány pomocí měření UV-VIS absorpčních spekter. Za tímto účelem byla připravena následující sada vzorků: 2 mg/l a 20 mg/l HK, 1 $\mu\text{mol/l}$ a 10 $\mu\text{mol/l}$ rhodaminu 6G, směs 2 mg/l HK a 1 $\mu\text{mol/l}$ rhodaminu 6G, směs 20 mg/l HK a 10 $\mu\text{mol/l}$ rhodaminu 6G. Stejně bylo postupováno i v případě mHK. Všechny roztoky byly doplňovány na finální objem (25 ml) fosfátovým pufrům, který byl používán ve všech předchozích experimentech. Výsledné roztoky ukazuje Obr. 14. Vzorky byly měřeny pomocí spektrofotometru UV-VIS HITACHI U-3900H se stejným nastavením jako v případě dialyzačních experimentů (viz kapitola 5.6.1). Všechny vzorky byly měřeny jednak proti rozpouštědлу (fosfátovému pufru), ale také proti příslušnému roztoku HK/mHK či rhodaminu 6G.



Obr. 14: Sada roztoků pro měření UV-VIS absorpčních spekter

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Charakterizace huminových vzorků

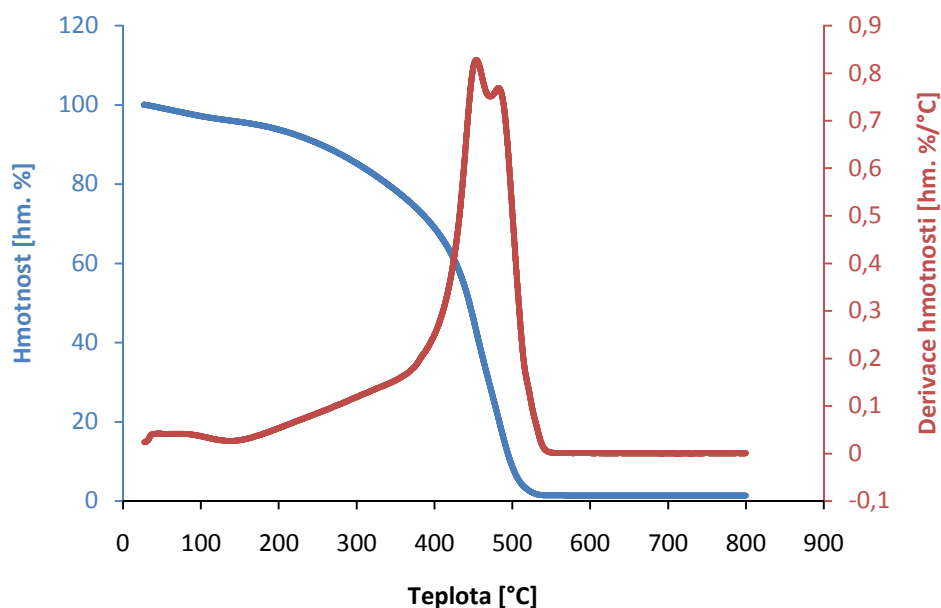
6.1.1 Elementární a termogravimetrická analýza

Pomocí elementární analýzy bylo zjištěno procentuální zastoupení hlavních prvků tvořících huminové kyseliny – uhlíku, kyslíku, dusíku, vodíku a síry. Výsledné hodnoty ukazuje *Tabulka 3*. Ze zjištěných výsledků je patrný vliv modifikace, kdy díky methylaci došlo u vzorku mHK ke zvýšení poměru H/C a naopak ke snížení poměru O/C.

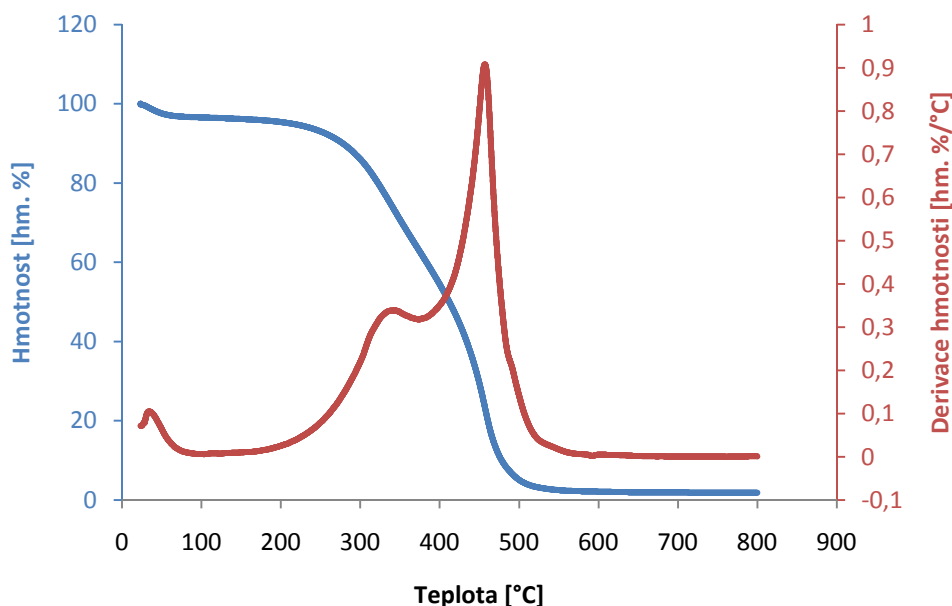
Tabulka 3: Elementární analýza HK a mHK (suché, bezpopelové vzorky)

	C [at. %]	N [at. %]	O [at. %]	H [at. %]	S [at. %]	H/C	O/C
HK	43,560	0,959	15,836	39,335	0,309	0,903	0,364
mHK	41,920	0,895	14,823	42,122	0,240	1,005	0,354

V grafech na *Obr. 15* a *Obr. 16* jsou znázorněny průběhy teplotních změn relativních hmotností vzorků, stanovené v rámci termogravimetrické analýzy v atmosféře O_2 . Teplota 150 °C byla zvolena jako mezní teplota pro stanovení zbytkové vlhkosti vzorku. V teplotním rozmezí 150–800 °C došlo ke spalování organické hmoty a při 800 °C zbyl popel představující anorganickou hmotu. Jak je patrné, průběh spalování je pro HK i mHK velmi podobný. Rozdíly v huminových vzorcích se však projeví v teplotní derivaci poklesu hmotnosti, která vyjadřuje rychlost, s jakou vzorek v daném okamžiku a v daném teplotním programu ztrácí svoji hmotnost. U mHK došlo k nárůstu píku termicky méně stabilní organické frakce (v oblasti teplot 300–400 °C), který odpovídá vnesení methylových skupin do struktury mHK.



Obr. 15: Termogravimetrická analýza HK v atmosféře O_2



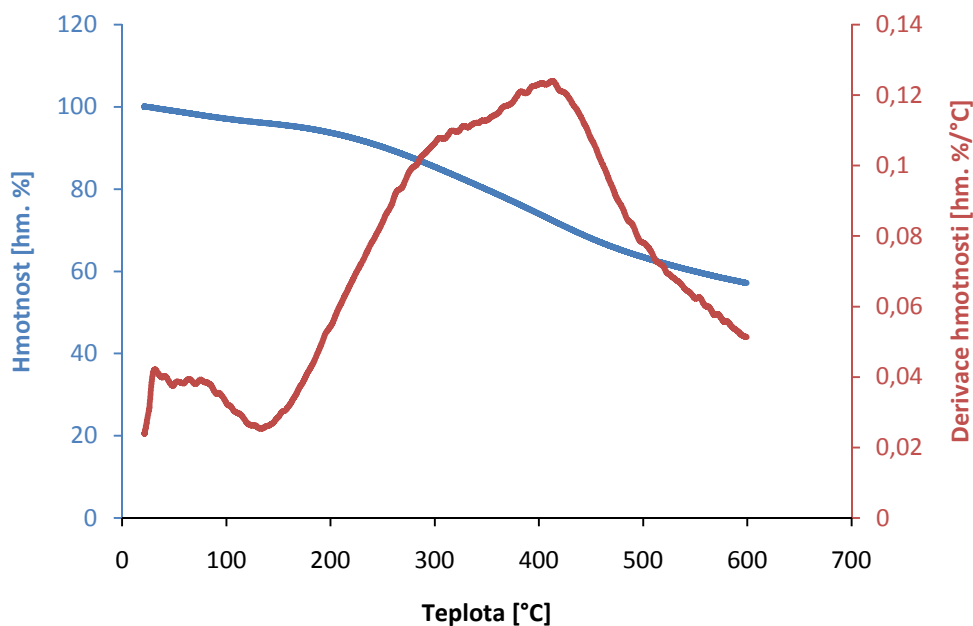
Obr. 16: Termogravimetrická analýza mHK v atmosféře O₂

Výsledky termogravimetrické analýzy v atmosféře O₂ shrnuje *Tabulka 4*. U vzorku mHK je patrný větší obsah popela, což bylo způsobeno přítomností křemíku z methylačního činidla TMS-DM.

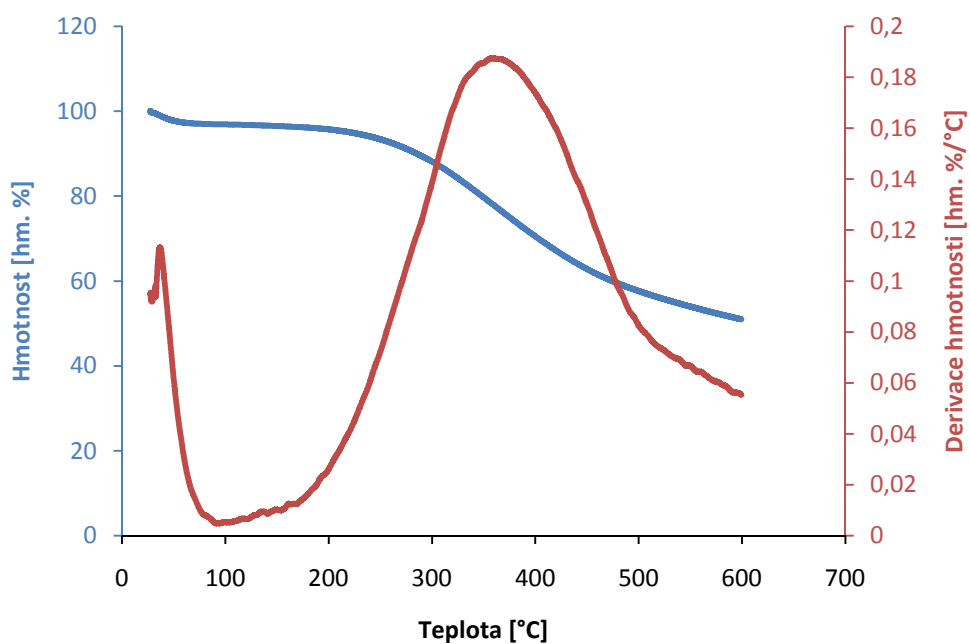
Tabulka 4: Termogravimetrická analýza HK a mHK (atmosféra O₂)

	Vlhkost [hm. %]	Popel [hm. %]	Organická hmota [hm. %]
HK	4,338	1,344	94,318
mHK	3,853	1,834	94,313

Termogravimetrická analýza huminových vzorků byla provedena také v inertní atmosféře dusíku. Za těchto podmínek nedocházelo ke spalování (na rozdíl od kyslíkaté atmosféry), ale pouze k termické degradaci vzorku, což poukazuje na termickou stabilitu materiálu. Naměřená data vynesena do grafů jsou znázorněna na *Obr. 17* a *Obr. 18*. Z výsledků je patrné, že HK i mHK mají velmi podobnou termickou stabilitu. V teplotní derivaci hmotnosti se však projeví rozdíly mezi oběma vzorky způsobené modifikací struktury mHK.



Obr. 17: Termogravimetrická analýza HK v atmosféře N_2



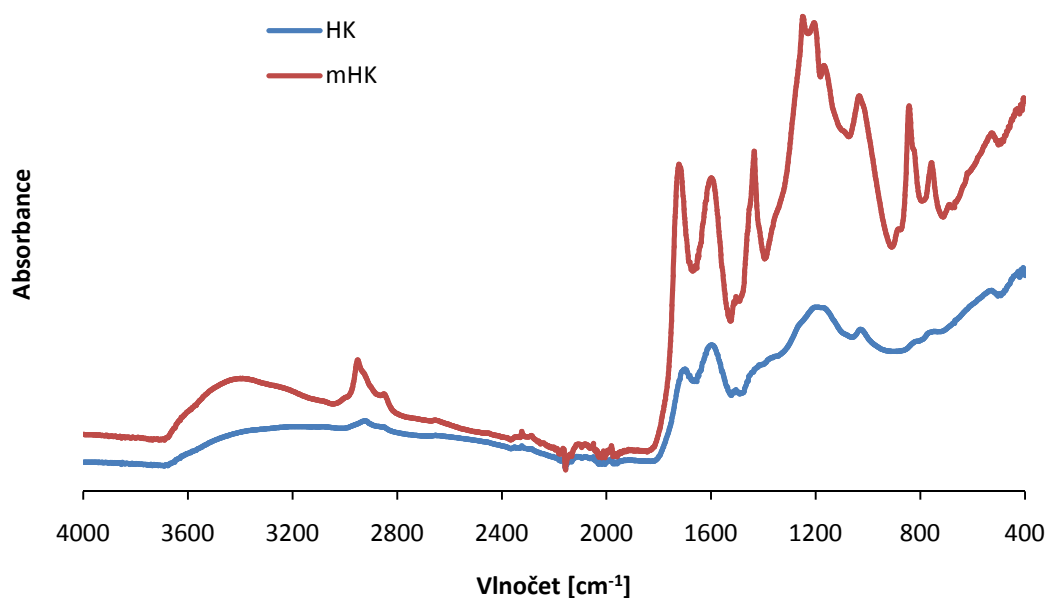
Obr. 18: Termogravimetrická analýza mHK v atmosféře N_2

6.1.2 FT-IR spektroskopie

Pro charakterizaci změn ve struktuře HK po methylování pomocí TMS-DM a potvrzení modifikace byla měřena absorbance v rozsahu vlnočtů $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Získaná vibrační spektra HK i mHK z techniky ATR jsou znázorněna na Obr. 19.

Ve vibračním spektru mHK jsou patrné změny oproti spektru nemodifikovaných HK. V oblasti vlnočtů 2950 cm^{-1} je u mHK zřejmý nárůst intenzity pásu odpovídající asymetrické

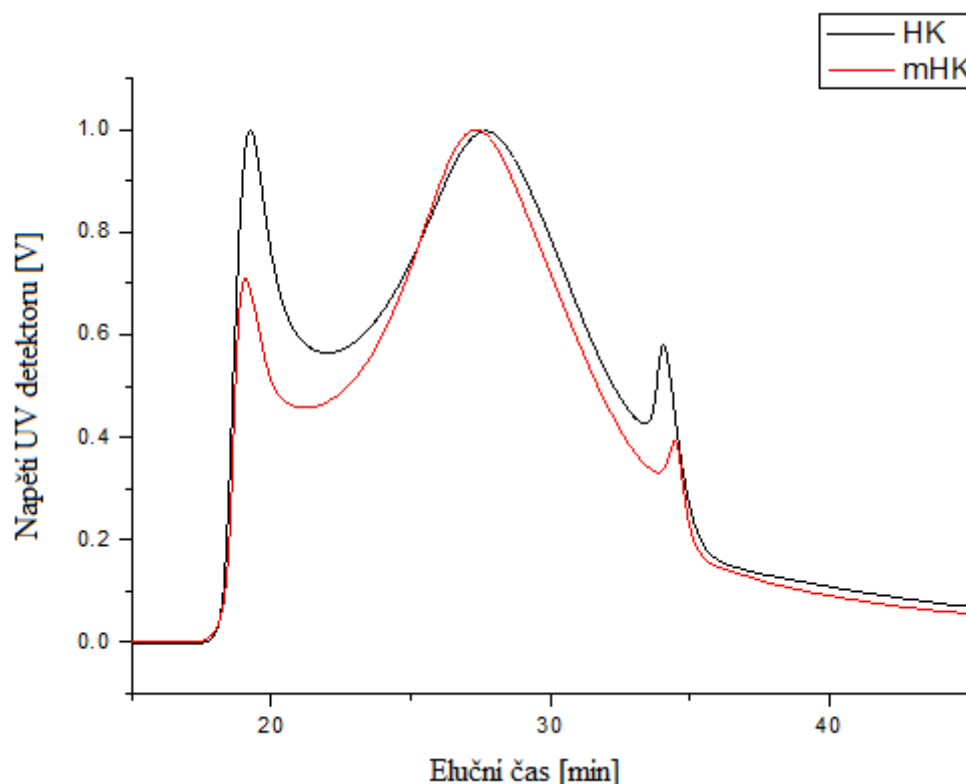
valenční vibraci C–H v CH₃. Další výrazná změna je v oblasti 1722 cm⁻¹, kde došlo v případě mHK ke zvýšení intenzity pásu symetrické valenční vibrace C=O v aryl esterech, což souvisí s modifikací COOH skupin za vzniku methylesterů. U mHK lze dále pozorovat značný nárůst absorpance oproti nemodifikovaným HK v oblasti 1435 cm⁻¹, která odpovídá deformační asymetrické vibraci C–H vazeb v methylových skupinách. Vliv modifikace je patrný i změnou ve valenčních vibracích C–C–O u aryl a alkyl esterů v oblastech 1206 cm⁻¹ a 1169 cm⁻¹. Shodných či velmi podobných změn ve vibračních spektrech mHK oproti HK bylo dosaženo i v pracích [41], [65] a [67]. Výše uvedené rozdíly ve vibračních spektrech potvrzují, že methylace HK proběhla úspěšně. Technikou DRIFTS bylo dosaženo stejných výsledků jako v případě měření totálního zeslabeného odrazu (ATR), což je dalším potvrzením úspěšné methylace. Spektra získaná z DRIFTS uvádí *Příloha 1*.



Obr. 19: FT-IR spektra HK a mHK (technika ATR)

6.1.3 SEC-MALS

Srovnání naměřené distribuce hmoty u obou typů huminových vzorků je znázorněno na *Obr. 20*. Jak je z grafu patrné, byly zaznamenány tři píky. První pík odpovídá agregátům huminových kyselin, druhý pík představuje supramolekuly huminových kyselin a třetí pík byl přiřazen volným molekulám. Dále je z grafu patrná mírně odlišná distribuce hmoty u mHK oproti HK, což lze přisoudit provedené modifikaci. Výsledky mohly být též ovlivněny koncentrací rozpouštědla, kdy za účelem lepšího rozpuštění byla navážka mHK rozpuštěna v 0,1M NaOH, zatímco nemodifikované HK byly rozpuštěny v 0,01M NaOH.



Obr. 20: Distribuce hmoty HK a mHK získaná pomocí SEC-MALS

Molekulové hmotnosti HK a mHK byly stanoveny relativně vůči kalibrační křivce získané měřením polystyrenových standardů. Výsledné hodnoty ukazuje *Tabulka 5*. Vliv methylace karboxylových skupin ve struktuře mHK se projevil mírně vyššími hodnotami molekulových hmotností v případě agregátů a supramolekul huminových kyselin.

Tabulka 5: Molekulové hmotnosti HK a mHK

	MW agregáty [kDa]	MW supramolekuly [kDa]	MW volné molekuly [kDa]
HK	$44,2 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,005$
mHK	$46,9 \pm 1,0$	$4,0 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,005$

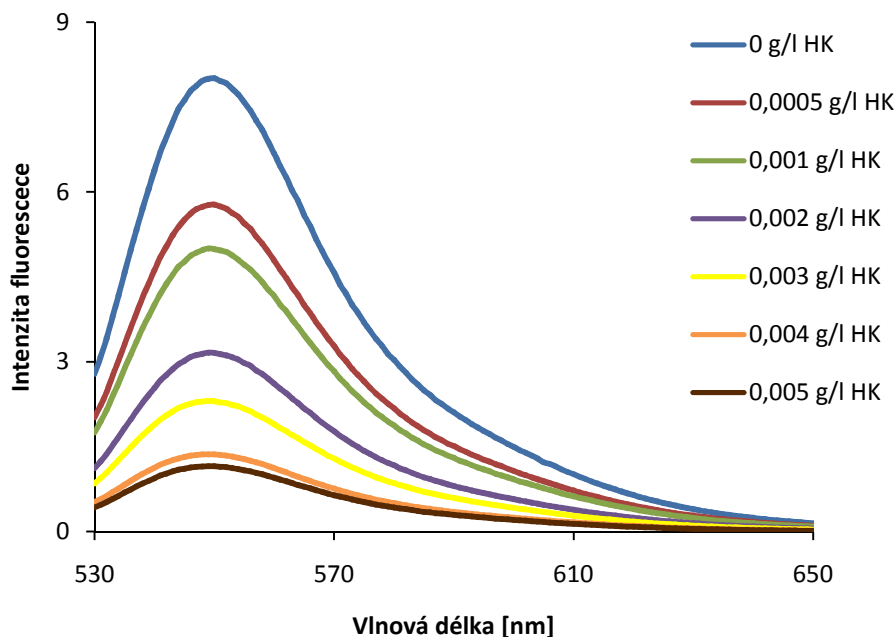
6.2 Zhášení fluorescence

Cílem těchto experimentů bylo pozorovat zhášení fluorescence rhodaminu 6G huminovými kyselinami a srovnat vliv modifikace HK na toto zhášení. Dalším cílem bylo určení mechanismu zhášení fluoreskujícího barviva pomocí měření dob života fluorescence rhodaminu 6G v přítomnosti zhášeče.

Sada vzorků obsahujících konstantní koncentraci rhodaminu 6G a rostoucí koncentraci HK/mHK (příprava viz kapitola 5.5.1) byla změřena ve fluorescenční křemenné kyvetě pomocí luminiscenčního spektrometru. Stejná sada vzorků byla změřena i na UV-VIS

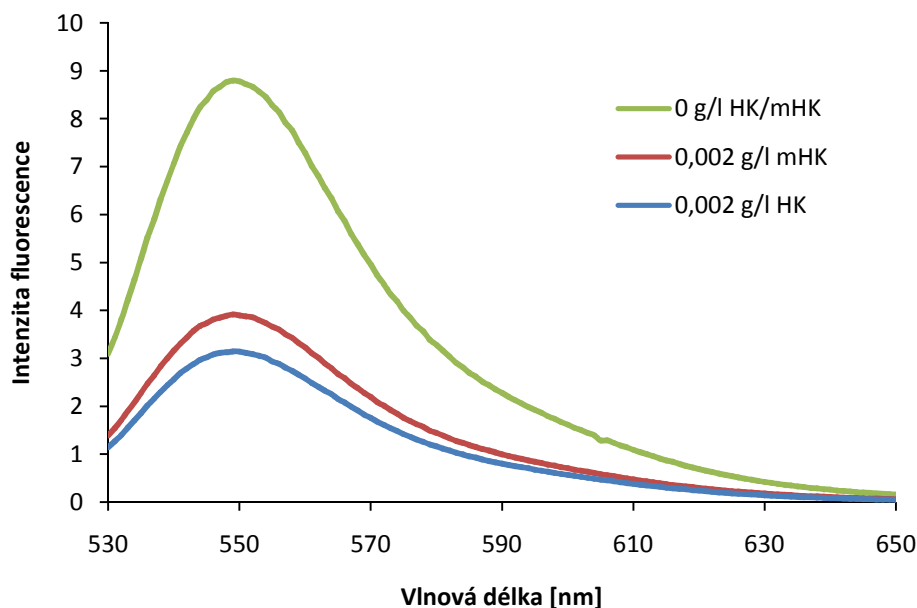
spektrofotometru a získané absorbance byly využity ke korekci naměřených intenzit fluorescence dle rovnice (2). U všech výsledků, prezentovaných na dalších řádcích této kapitoly, je pracováno s korigovanými hodnotami intenzity fluorescence.

Výsledná emisní spektra, tedy závislost intenzity fluorescence na vlnové délce, v případě sady vzorků s nemodifikovanými HK ukazuje *Obr. 21*. Z výsledků je patrné, že s rostoucí koncentrací HK klesala intenzita fluorescence rhodaminu 6G. Stejného trendu bylo dosaženo i v případě vzorků s mHK (viz *Příloha 2*). Oba typy huminových kyselin tedy fungovaly jako významný zhášec fluorescence rhodaminu 6G.



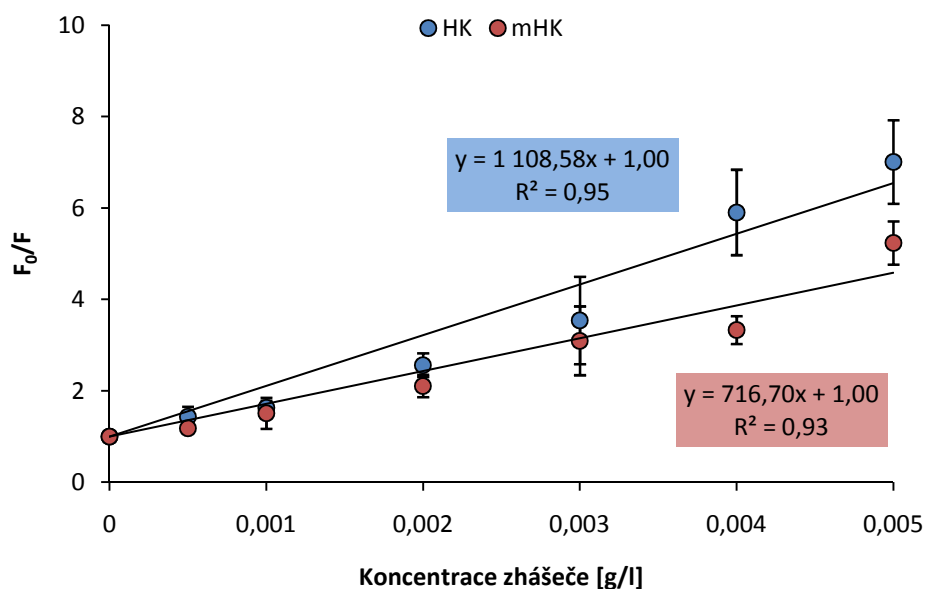
Obr. 21: Pokles korigované intenzity fluorescence rhodaminu 6G s rostoucí koncentrací HK

Methylované HK (mHK) vykazovaly stejný trend zhášení jako nemodifikované HK. Mírný rozdíl je však patrný při porovnání emisních spekter rhodaminu 6G v přítomnosti stejné koncentrace HK, resp. mHK. Příklad je znázorněn v grafu na *Obr. 22*. Z grafu je zřejmé, že intenzita fluorescence rhodaminu 6G je v přítomnosti 0,002 g/l HK nižší než při stejné koncentraci mHK. Stejných výsledků se dosáhlo i u ostatních koncentrací HK a mHK. Nemodifikované HK tedy zhášely fluorescenci rhodaminu 6G o něco výrazněji než mHK. Je-li zhášení známkou a mírou interakce huminových kyselin s rhodaminem 6G, pak pokles míry zhášení naznačuje omezení dané interakce, což lze přisoudit vlivu methylace ve struktuře mHK.



Obr. 22: Porovnání zhášení rhodaminu 6G při stejné koncentraci HK a mHK

Maxima intenzit fluorescence všech studovaných vzorků byla použita pro sestrojení závislostí popsaných Stern-Volmerovou rovnicí, viz (3). Výsledky pro vzorky s HK i mHK jsou znázorněny v grafu na Obr. 23. V této závislosti je též patrný vliv methylace, kdy vyšší intenzita fluorescence při vlnové délce emisního maxima v přítomnosti mHK vedla k nižším hodnotám poměru F_0/F než u nemodifikovaných HK.



Obr. 23: Poměr korigovaných intenzit fluorescence rhodaminu 6G s/bez zhášeče v závislosti na koncentraci HK/mHK

Z doposud zmiňovaných výsledků však nelze určit, o jaký typ mechanismu zhášení (dynamický vs. statický) se jedná. Není jasné, jestli směrnice regresních přímek představovala Stern-Volmerovu zhášecí konstantu K_D nebo asociační konstantu vzniku komplexu K_S . Pro

vyřešení těchto nejasností bylo provedeno měření doby života fluorescence rhodaminu 6G. Stejná sada vzorků jako v případě měření emisních spekter byla podrobena analýze časově rozlišené fluorescence metodou TCSPC. Výsledky ukázaly, že rhodamin 6G vykazoval jedinou dobu života, která se výrazně neměnila s rostoucí koncentrací obou typů zhášeců ve vzorcích (viz *Tabulka 6*). Z toho plyne, že mechanismus zhášení barviva huminovými kyselinami byl statický. Doba života fluorescence rhodaminu 6G byla stanovena na 3,95 ns.

Tabulka 6: Doba života fluorescence rhodaminu 6G v přítomnosti zhášeče

	HK	mHK
Koncentrace zhášeče [g/l]	Doba života fluorescence barviva [ns]	Doba života fluorescence barviva [ns]
0	$3,96 \pm 0,01$	$3,96 \pm 0,01$
0,000 5	$3,96 \pm 0,004$	$3,97 \pm 0,007$
0,001	$3,96 \pm 0,003$	$3,96 \pm 0,002$
0,002	$3,95 \pm 0,001$	$3,95 \pm 0,002$
0,003	$3,95 \pm 0,002$	$3,95 \pm 0,005$
0,004	$3,94 \pm 0,001$	$3,94 \pm 0,005$
0,005	$3,95 \pm 0,001$	$3,95 \pm 0,003$

Statický mechanismus zhášení je charakterizován vznikem vazby mezi reaktanty a tvorbou nefluoreskujícího komplexu. Stern-Volmerova rovnice, popisující pokles intenzity fluorescence u studovaných reakcí, tedy obsahuje asociační konstantu vzniku komplexu K_S . Hodnota této konstanty byla stanovena na $1\,108,58\text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$ v případě nemodifikovaných HK a na $716,70\text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$ v případě mHK. Ze zjištěných hodnot je tedy patrné, že interakce za vzniku nefluoreskujícího komplexu probíhala ochotněji u nemodifikovaných HK, což lze přisoudit snížení obsahu vazebných míst ve struktuře mHK vlivem modifikace. Methylace sice způsobila mírné rozdíly ve studované interakci, mHK nicméně také poměrně výrazně zhášely fluorescenci rhodaminu 6G. Z toho vyplývá, že interakce nebyla podmíněna přítomností karboxylových skupin ve struktuře huminových kyselin.

Využití fluorescenčních technik se ukázalo jako vhodné pro studium interakce huminových kyselin s rhodaminem 6G. O rostoucí oblibě experimentů založených na pozorování fluorescence svědčí i velké množství publikací zabývajících se touto problematikou. Pro navazující experimenty bude zajímavé se zaměřit také na opačný proces, než je v této diplomové práci – na změny ve fluorescenci huminových kyselin způsobené přítomností organických iontů. Dalším směrem navazujícího zkoumání by mohlo být studium zhášení fluorescence různě nabitých organických látek huminovými kyselinami nebo srovnání zhášecích vlastností HK z různých zdrojů (lignitické, standardy, apod.).

6.3 Rovnovážná dialýza

V další sadě experimentů bylo sledováno rovnovážné rozdělení rhodaminu 6G mezi rezervoáry s přítomností, resp. absencí HK/mHK, oddělenými dialyzační membránou. Při popisu takového systému předpokládáme, že v okamžiku dosažení rovnováhy je určité množství rhodaminu 6G (Rh6G) vázáno na HK/mHK v přijímací komoře (viz *Obr. 13*)

a koncentrace volného (nenavázaného) barviva je na obou stranách membrány stejná. Stav dosažení rovnováhy byl zjišťován každodenním měřením absorbance barviva ve zdrojové komoře difúzní cely. V rovnováze platí pro sledovanou reakci vztah:

$$K = \frac{[\text{HK} - \text{Rh6G}]^p}{[\text{HK}]^n \cdot [\text{Rh6G}]^m}, \quad (6)$$

kde K je rovnovážná konstanta, $[\text{HK} - \text{Rh6G}]$ je koncentrace komplexu, $[\text{HK}]$ představuje koncentraci vazebných míst ve struktuře HK, $[\text{Rh6G}]$ je koncentrace volného barviva a n , m i p prezentují stechiometrické koeficienty popisující interakci mezi HK a rhodaminem 6G. Členy v rovnici (6) nicméně neznáme, a protože je hlavním předmětem zájmu dialyzačních experimentů změna volného barviva na vázané, byla pro popis dané interakce definována zdánlivá rovnovážná konstanta K_{app} , pro kterou platí:

$$K_{\text{app}} = \frac{[\text{Rh6G}_{\text{vázané}}]}{[\text{Rh6G}_{\text{volné}}]}, \quad (7)$$

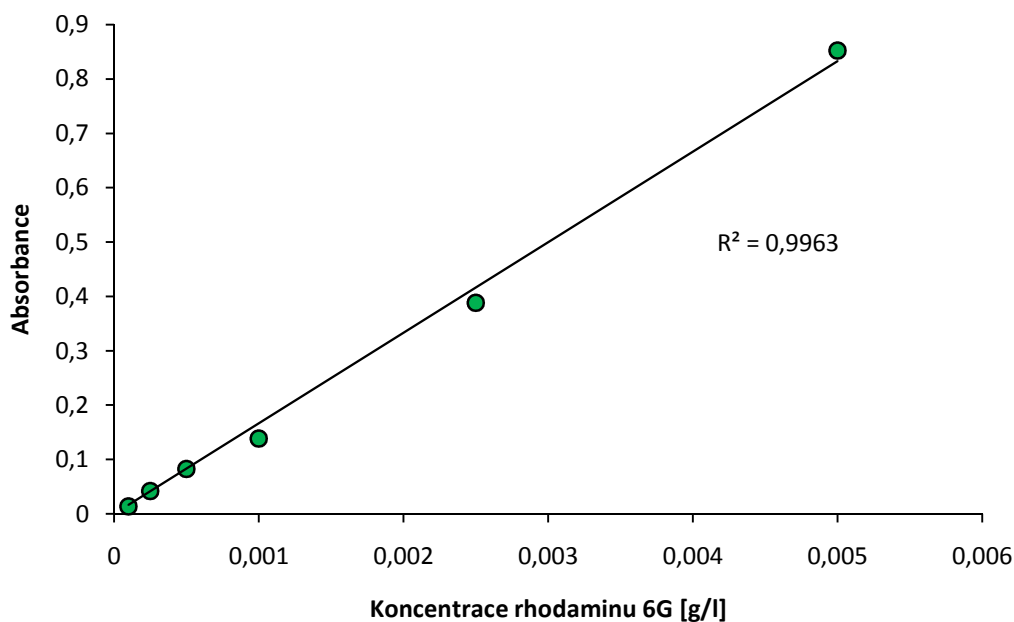
kde $[\text{Rh6G}_{\text{vázané}}]$ je molární koncentrace barviva vázaného na HK/mHK v přijímací komoře a $[\text{Rh6G}_{\text{volné}}]$ je molární koncentrace roztoku barviva ve zdrojové komoře difúzní cely ve stavu rovnováhy. Výraz „zdánlivá“ ilustruje fakt, že tato konstanta neuvažuje vliv koncentrace vazebných skupin huminových kyselin na posun interakční rovnováhy. Koncentrace volného rhodaminu 6G v difúzní cele bez přítomnosti HK (zdrojová cela) byla zjišťována z naměřených absorbancí metodou kalibrační přímky. Koncentrace navázaného rhodaminu 6G byla počítána dle vztahu, odvozeném z koncentrační bilance difúzních cel ve stavu rovnováhy:

$$[\text{Rh6G}_{\text{vázané}}] = [\text{Rh6G}]^0 - 2 \cdot [\text{Rh6G}_{\text{volné}}], \quad (8)$$

kde $[\text{Rh6G}]^0$ je koncentrace roztoku barviva ve zdrojové cele na začátku experimentu. Uvedená bilance platí pouze za předpokladu, že objemy roztoků ve zdrojové a přijímací cele jsou stejné a v čase neměnné.

6.3.1 Kalibrační přímka

Roztoky kalibrační řady připravené dle kapitoly 5.6.1 byly změřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru. Ze získaných absorpčních spekter vyplynulo, že absorbance dosáhla maxima při 527 nm, respektive při 526 nm. Při těchto vlnových délkách byla tudíž sledována absorbance roztoků barviva ve zdrojových komorách difúzních cel v rámci všech dialyzačních experimentů. Kalibrační přímka a její hodnota spolehlivosti je znázorněna na *Obr. 24*. Regresní rovnice této kalibrační přímky posloužila k výpočtu molárních koncentrací barviva ve zdrojových komorách difúzních cel v průběhu měření.



Obr. 24: Kalibrační přímka rhodaminu 6G

6.3.2 Stanovení zdánlivých rovnovážných konstant

Souhrn všech měřených roztoků a jejich koncentrací ukazuje *Tabulka 7*. Koncentrace roztoků huminových kyselin byla zvolena na základě výsledků práce [65]. U měřených roztoků byla porovnávána nejen samotná hodnota zdánlivé rovnovážné konstanty K_{app} , ale také vliv selektivní methylace na tuto hodnotu.

Tabulka 7: Počáteční koncentrace roztoků v dialyzačních experimentech

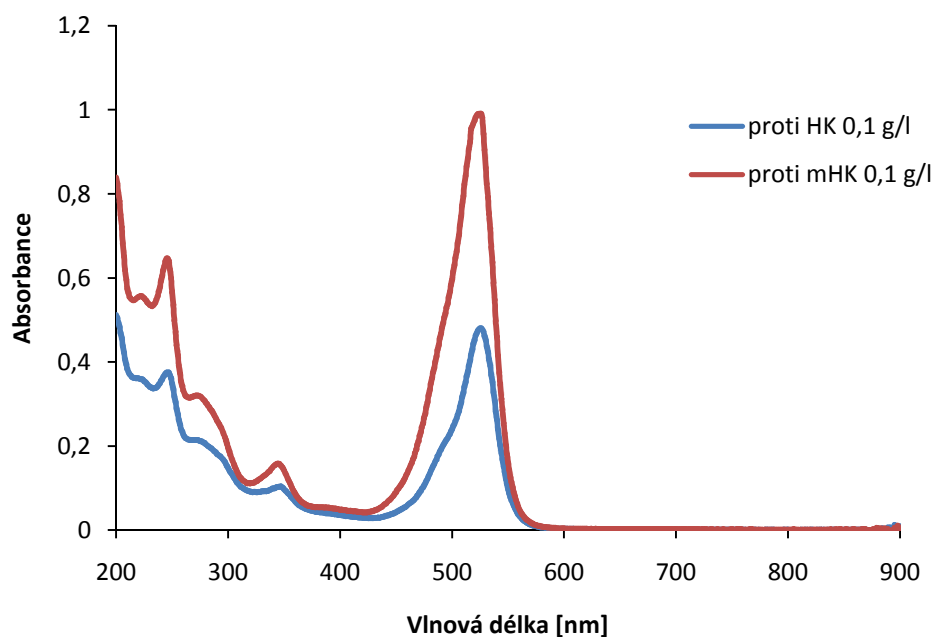
Přijímací cela	Zdrojová cela	Přijímací cela	Zdrojová cela
0,10 g/l HK	0,100 g/l Rh6G	0,10 g/l mHK	0,100 g/l Rh6G
0,10 g/l HK	0,050 g/l Rh6G	0,10 g/l mHK	0,050 g/l Rh6G
0,10 g/l HK	0,025 g/l Rh6G	0,10 g/l mHK	0,025 g/l Rh6G
0,10 g/l HK	0,010 g/l Rh6G	0,10 g/l mHK	0,010 g/l Rh6G
0,05 g/l HK	0,010 g/l Rh6G	0,05 g/l mHK	0,010 g/l Rh6G

Studium všech měřených koncentračních kombinací bylo poměrně časově náročné. Stavů rovnováhy (vyrovnání koncentrace volného barviva na obou stranách membrány) bylo dosaženo v průměru za 547 hodin trvání experimentu. Fotografie studovaných roztoků v dialyzačních aparaturách na začátku a při ukončení experimentu (ve stavu rovnováhy) jsou pro větší přehlednost uvedeny v příloze (*Příloha 3 až Příloha 18*).

V případě experimentů s roztoky barviva o koncentracích 0,1 g/l se ukázalo, že tato koncentrace není příliš vhodná, neboť i po dosažení rovnováhy bylo nutné roztok barviva ředit pro naměření absorpací nižších než 1. Navíc v případě mHK došlo k vysrážení huminových kyselin v přijímací komoře, což mohlo být způsobeno více faktory (vysokou koncentrací barviva či kvalitou difúzní cely – prasklina v plášti difúzní cely a tedy nutnost

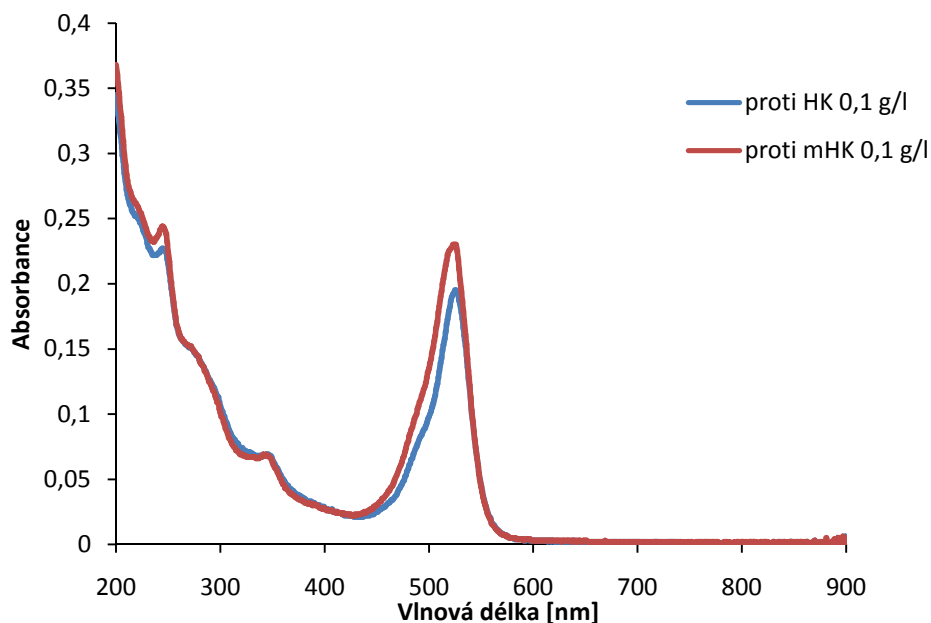
přítomnosti těsnícího kroužku). Ze zmíněných důvodů nebyly výsledky z těchto difúzních cel brány do celkového hodnocení interakcí a zdánlivých rovnovážných konstant.

V grafu na *Obr. 25* jsou znázorněna absorpční spektra rhodaminu 6G o výchozí koncentraci 0,05 g/l ve stavu rovnováhy. Z grafu lze vyčíst, že absorbance barviva je ve stavu rovnováhy vyšší u mHK než u nemodifikovaných HK. Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky a naměřených absorbancí bylo vypočítáno, že koncentrace barviva poklesla oproti počáteční koncentraci na 5,6 % u reakce s nemodifikovanými HK a na 11,8 % u reakce s mHK. Výsledky ukazují, že mHK díky modifikaci karboxylových skupin vázaly barvivo méně než přírodní nemodifikované HK.



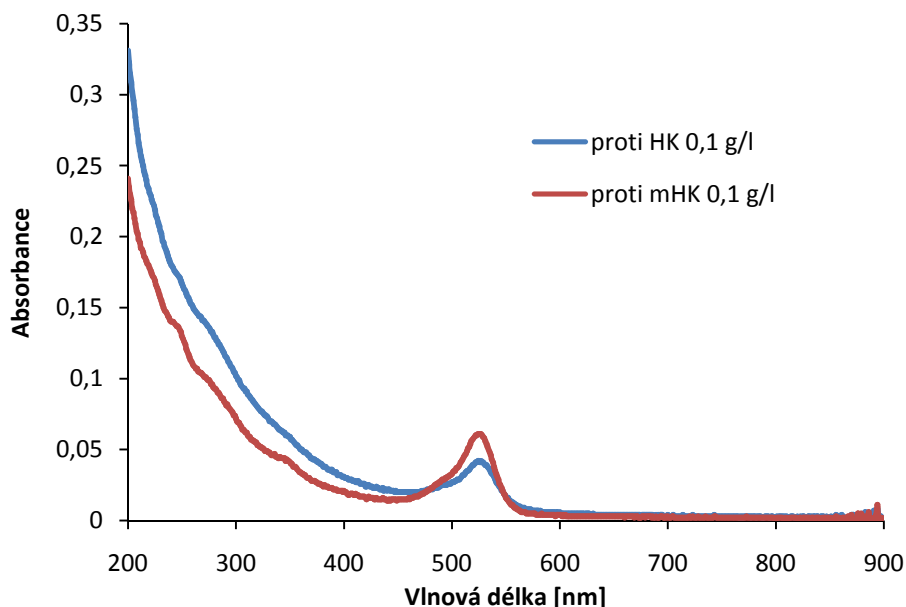
Obr. 25: Absorpční spektra Rh6G ve stavu rovnováhy, výchozí koncentrace 0,05 g/l

Také v případě rhodaminu 6G o výchozí koncentraci 0,025 g/l byla absorbance barviva při interakci s mHK ve stavu rovnováhy vyšší než při interakci s nemodifikovanými HK, což ukazuje *Obr. 26*. Koncentrace rhodaminu 6G poklesla v průběhu experimentu oproti počáteční koncentraci na 4,8 % u interakce s nemodifikovanými HK a na 5,6 % u interakce s mHK.



Obr. 26: Absorpční spektra Rh6G ve stavu rovnováhy, výchozí koncentrace 0,025 g/l

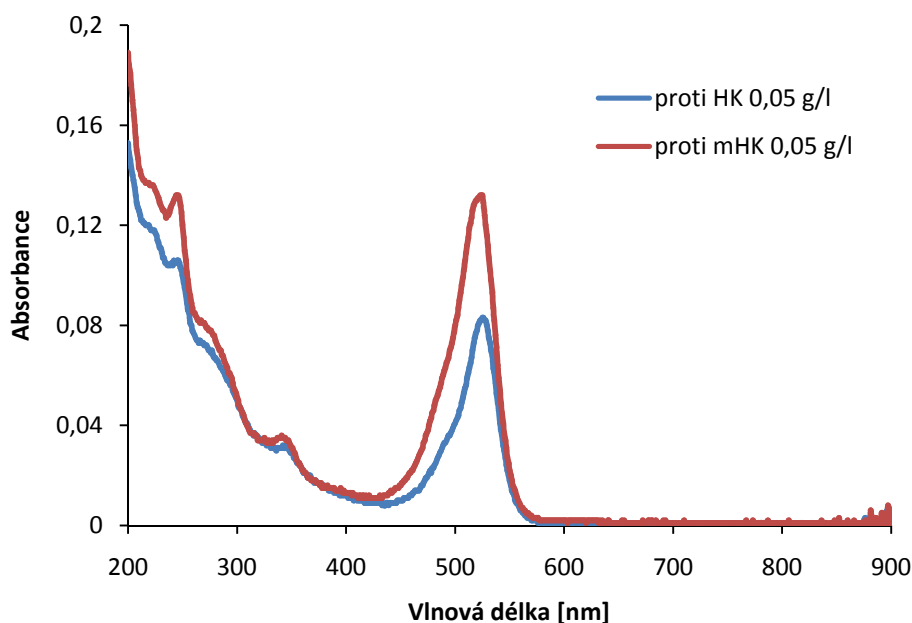
Na Obr. 27 jsou znázorněna absorpční spektra rhodaminu 6G o výchozí koncentraci 0,01 g/l ve stavu rovnováhy. I v tomto případě je patrný vliv modifikace, kdy je absorbance barviva při interakci s mHK v daném časovém úseku vyšší než při interakci s nemodifikovanými HK. Na mHK se tedy barvivo vázalo méně. Koncentrace rhodaminu 6G poklesla oproti počáteční koncentraci na 2,5 % při reakci s nemodifikovanými HK a na 3,6 % při reakci s mHK.



Obr. 27: Absorpční spektra Rh6G ve stavu rovnováhy, výchozí koncentrace 0,01 g/l

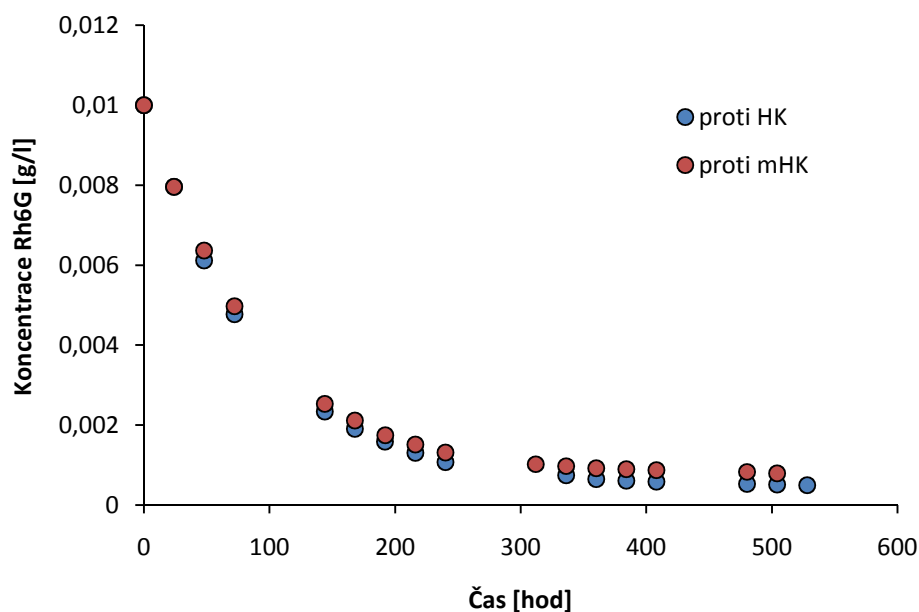
Z důvodu posouzení vlivu koncentrace huminových kyselin na interakci v difúzních celách byl proveden experiment s koncentrací 0,05 g/l HK i mHK proti roztoku barviva o nejnižší ze

studovaných koncentrací, tj. 0,01 g/l. Výsledná absorpční spektra rhodaminu 6G o této výchozí koncentraci ve stavu rovnováhy ukazuje *Obr. 28*. Methylace opět způsobila slabší interakci barviva s mHK, a tedy vyšší absorbanci v daném časovém úseku než u nemodifikovaných HK. Na interakci měla vliv i koncentrace roztoku HK, resp. mHK, neboť porovnání s grafem na *Obr. 27* ukazuje vyšší hodnotu v maximu absorbance u 0,05 g/l HK/mHK oproti dvojnásobné koncentraci. Na HK/mHK o koncentraci 0,1 g/l se tedy barvivo vázalo lépe než na HK/mHK o koncentraci 0,05 g/l. Tento výsledek lze přisoudit většímu obsahu vazebných míst pro barvivo v případě vyšší koncentrace roztoků huminových kyselin.



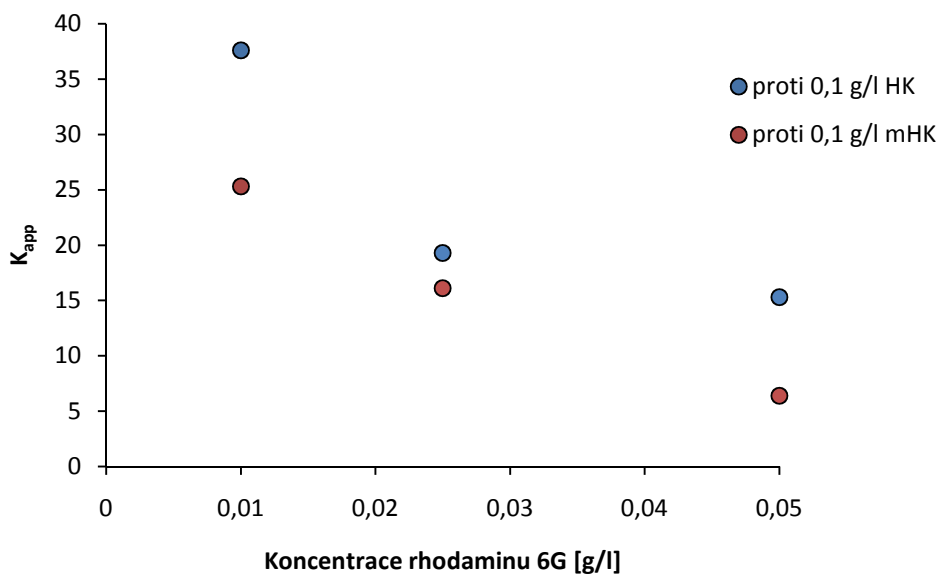
Obr. 28: Absorpční spektra Rh6G ve stavu rovnováhy, výchozí koncentrace 0,01 g/l

U všech výše zmiňovaných rovnovážných dialýz došlo v průběhu měření k výraznému poklesu koncentrace rhodaminu 6G v zdrojové komoře difúzní cely vlivem interakce s huminovými kyselinami na druhé straně dialyzační membrány. Příklad změny koncentrace barviva ve zdrojové komoře difúzní cely v závislosti na čase ukazuje *Obr. 29*. Pokles koncentrace v čase vykazuje exponenciální charakter. V případě nemodifikovaných HK jakožto reaktantu je patrná nižší koncentrace rhodaminu 6G oproti reakci s mHK, čímž se projevil vliv methylace. Stejného trendu bylo dosaženo u všech experimentů dialýzy v difúzních celách. I přes snížený obsah vazebných míst ve struktuře mHK, a tedy slabší interakci s barvivem oproti přírodním HK, je patrné, že rovnovážná dialýza s mHK v přijímací cele probíhala i tak velmi výrazně. Z toho plyne, že do interakce mezi huminovými kyselinami a rhodaminem 6G se významně zapojily i jiné funkční skupiny ve struktuře HK a na interakci se tak mohly podílet i další vazebné mechanismy než jen elektrostatické síly.

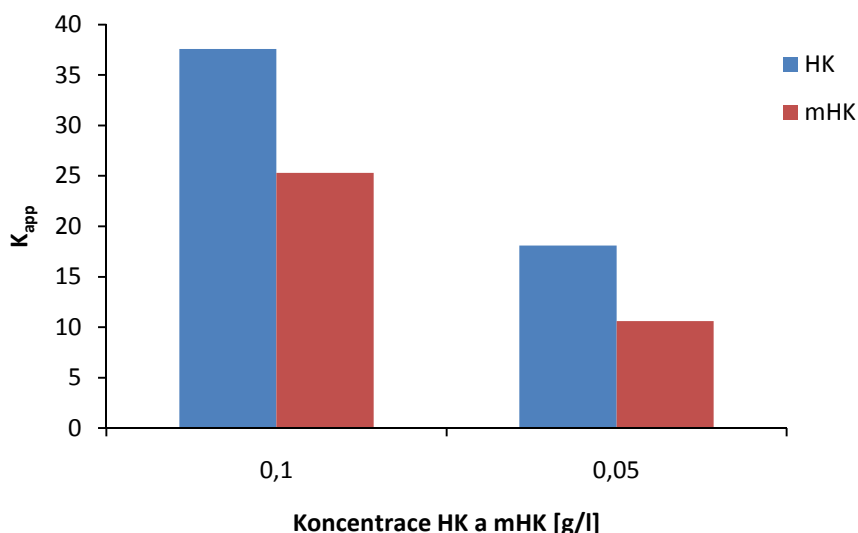


Obr. 29: Závislost koncentrace barviva ve zdrojové komoře difúzní cely na čase

Hodnoty zdánlivé rovnovážné konstanty pro všechny měřené kombinace roztoků byly počítány dle rovnice (7). Výsledky na Obr. 30 ukazují, že s rostoucí koncentrací rhodaminu 6G klesala hodnota zdánlivé rovnovážné konstanty. Tato závislost byla způsobena obsazováním vazebných míst ve struktuře huminových kyselin s rostoucí koncentrací rhodaminu 6G. Hodnoty K_{app} jsou nižší v případě dialýzy s mHK oproti dialýze s nemodifikovanými HK, což potvrzuje ovlivnění interakce změnami ve struktuře mHK. Dále jsou z výsledků (viz Obr. 31) patrné klesající hodnoty K_{app} s klesající koncentrací HK a mHK, což lze přisoudit snižujícímu se obsahu vazebných míst pro barvivo ve struktuře huminových kyselin.



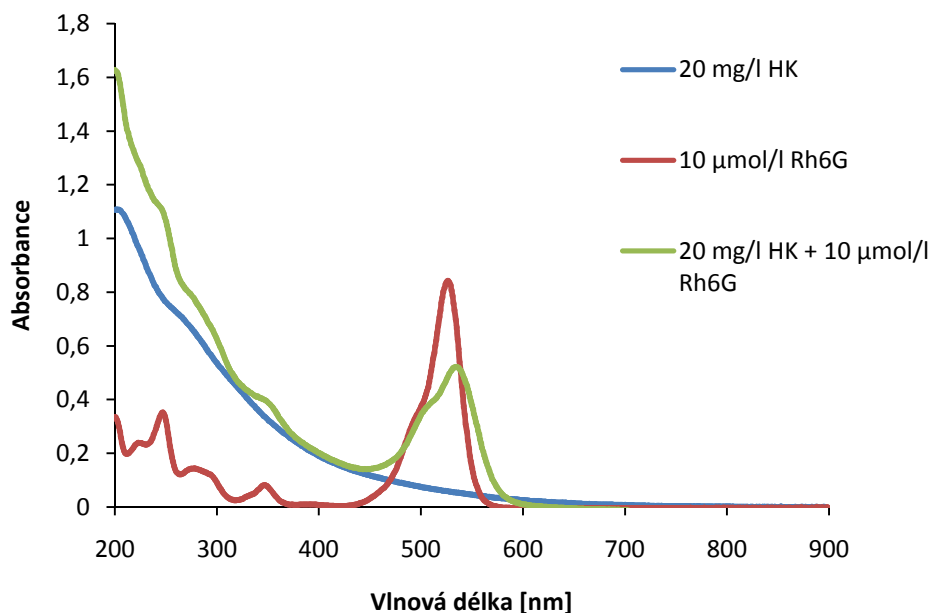
Obr. 30: Závislost zdánlivé rovnovážné konstanty na koncentraci rhodaminu 6G



Obr. 31: Závislost zdánlivé rovnovážné konstanty na koncentraci HK a mHK

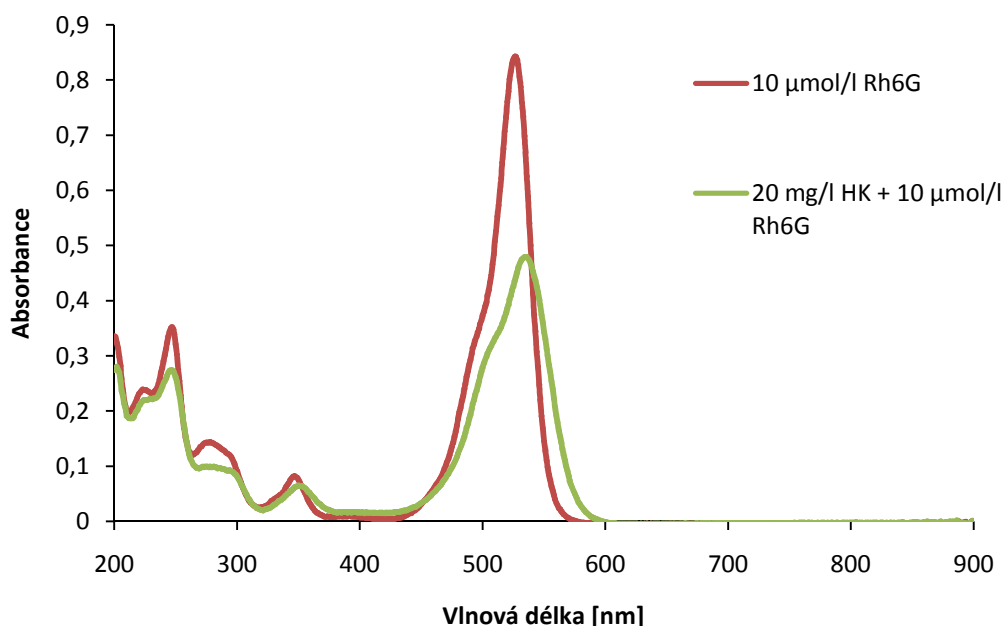
6.4 Diferenční UV-VIS

V grafu na Obr. 32 jsou zobrazena UV-VIS spektra roztoku HK, roztoku rhodaminu 6G a jejich směsí, vše měřené proti fosfátovému pufru. Stejný trend v UV-VIS spektrech měřených proti fosfátovému pufru splňovaly jak mHK o stejné koncentraci, tak i reaktanty s nižší koncentrací. Grafy jsou k nahlédnutí v příloze (Příloha 19 až Příloha 21). Pro cílené zaměření se na konkrétní změny v absorpčním spektru rhodaminu 6G při interakci s HK byla použita diferenční UV-VIS, tedy měření směsi proti jednomu z reaktantů.



Obr. 32: UV-VIS spektra měřená proti fosfátovému pufru

Pro zjištění změn v absorpčním spektru rhodaminu 6G byla směs barviva a huminových kyselin měřena proti roztoku dané HK o koncentraci shodné s jejich koncentrací ve směsi. Výsledné diferenční UV-VIS spektrum směsi ukazuje *Obr. 33*. Z grafu je patrné, že díky interakci s HK došlo u spektra rhodaminu 6G k bathochromnímu (červenému) posunu a hypochromnímu efektu. Stejných poklesů maxim absorpce a jejich posunutí k vyšším vlnovým délkám bylo dosaženo jak v případě měření proti mHK, tak i u nižších koncentrací (viz *Příloha 22 až Příloha 24*). Methylace karboxylových skupin ve struktuře mHK se projevila pouze mírně nižším poklesem a posunem maxima absorpce barviva v porovnání s nemodifikovanými HK.

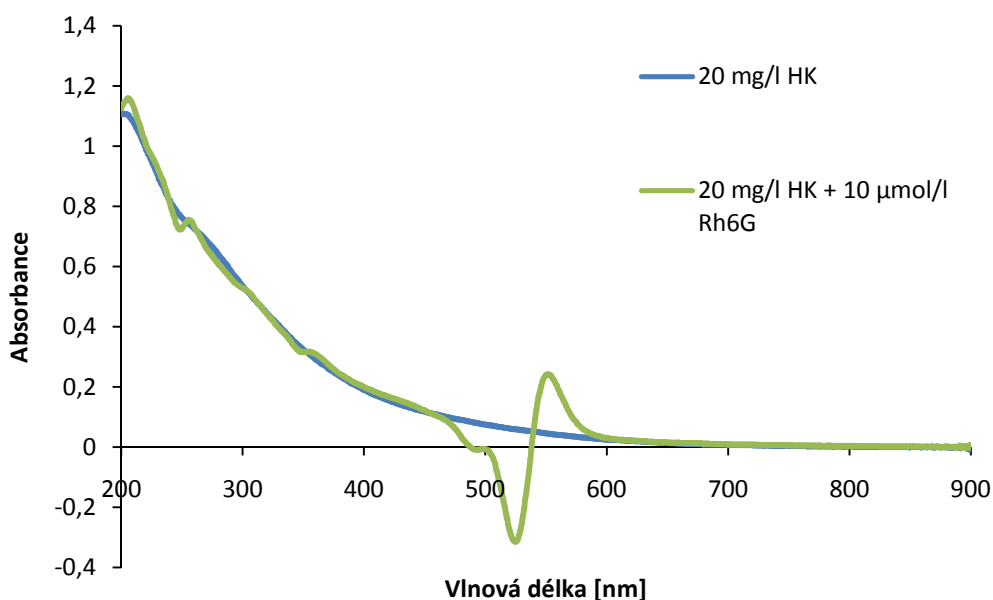


Obr. 33: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky Rh6G s diferenčním spektrem složky Rh6G o stejné koncentraci ve směsi s HK (spektrum směsi měřeno proti roztoku HK o odpovídající koncentraci)

Měření diferenční UV-VIS spektroskopie s roztokem HK nebo mHK v referenční kyvetě bylo motivováno předpokladem, že mezi reaktanty dochází k π - π interakci. Tato teorie byla podpořena studií [49], ve které autoři analyzovali interakci malachitové zeleně s HK pomocí diferenční UV-VIS a dospěli k výsledkům ukazujícím na přítomnost π - π interakcí mezi reaktanty. Rhodamin 6G a malachitová zeleň sice vykazují odlišnou strukturu, nicméně obě látky obsahují delokalizovaný systém π -vazeb, z čehož plyne předpoklad π - π interakce i v případě rhodaminu 6G použitým v této práci. Výsledky prezentované na *Obr. 33* korespondují s výsledky ze studie [49], a tudíž lze potvrdit, že u rhodaminu 6G došlo vlivem interakce s HK a mHK ke změně konformace a že mezi reaktanty vznikla π - π interakce.

Pro analýzu změn v HK a mHK při interakci s barvivem byla dále směs těchto dvou reaktantů měřena proti příslušnému roztoku rhodaminu 6G. Diferenční UV-VIS spektrum směsi je znázorněno na *Obr. 34*. V grafu jsou patrné výkyvy v hodnotách absorpce směsi v oblasti píku rhodaminu 6G, což lze přičíst rozdílu roztoků barviva v obou křemenných kyvetách. Zatímco v kyvetě se vzorkem byl rhodamin 6G ovlivněn interakcí s HK, v referenční kyvetě se nacházel samotný roztok rhodaminu 6G, který nebyl ovlivněn žádnou

interakcí. V oblasti píku barviva tedy nelze srovnávat změny v absorpci záření strukturou HK. V ostatních oblastech vlnových délek však signál směsi víceméně kopíruje signál HK, z čehož plyne nevýrazná změna ve struktuře HK při interakci s rhodaminem 6G. Stejného trendu v naměřených UV-VIS spektrech bylo dosaženo i v případě mHK a nižších koncentrací reaktantů (viz Příloha 25 až Příloha 27).



Obr. 34: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky HK s diferenčním spektrem složky HK o stejné koncentraci ve směsi s Rh6G (spektrum směsi měřeno proti roztoku Rh6G o odpovídající koncentraci)

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na studium interakce huminových kyselin s rhodaminem 6G, představující modelový organický ion. Cílem práce bylo stanovit vliv chemické modifikace HK, konkrétně selektivní methylace karboxylových skupin, na tuto interakci. Na základě literární rešerše byly k analýze interakcí vybrány zhášení fluorescence, dialýza v difúzních celách a diferenční UV-VIS spektroskopie.

V rámci experimentální části práce bylo alkalickou extrakční metodou z lignitu izolováno potřebné množství HK, z čehož byla reprezentativní část selektivně methylována pomocí TMS-DM. Elementární analýzou bylo stanoveno základní prvkové složení obou typů HK a potvrzena methylace díky poklesu poměru O/C a zvýšení poměru H/C u mHK. Termogravimetrickou analýzou v atmosféře O₂ byl zjištěn vyšší obsah popela a změny v teplotní derivaci úbytku hmotnosti, čímž se též potvrdila methylace. Rozdíly mezi huminovými vzorky způsobené modifikací struktury se potvrdily i studiem termické stability v atmosféře N₂. Úspěšná modifikace byla prokázána také FT-IR spektroskopií s technikami ATR a DRIFTS, kdy u mHK došlo k nárůstu absorpance v oblastech vlnočtů charakteristických pro methylové skupiny a estery. Technikou SEC-MALS byl pozorován mírný rozdíl v distribuci hmoty mezi oběma vzorky huminových kyselin a větší agregáty a supramolekuly v případě mHK.

Interakce mezi methylovanými, resp. původními HK, a modelovou nabitou organickou látkou (rhodamin 6G) byla studována vybranou skupinou spektroskopických a fyzikálně-chemických experimentálních technik. Bylo zjištěno, že v důsledku interakce intenzita fluorescence rhodaminu 6G výrazně klesala s rostoucí koncentrací obou typů huminových kyselin. Nemodifikované HK i mHK tedy potvrdily svoji úlohu jako zhášec fluorescence barviva. Mechanismus zhášení byl pomocí měření doby života fluorescence stanoven jako statický a doba života rhodaminu 6G měla hodnotu 3,95 ns. Ze Stern-Volmerovy závislosti byly určeny asociační konstanty vzniku komplexu (K_S). U nemodifikovaných HK byla tato konstanta vyšší oproti mHK, což naznačuje omezení interakce s barvivem vlivem methylace ve struktuře mHK. Hodnoty zdánlivé rovnovážné konstanty (K_{app}) zjišťované z experimentů dialýzy v difúzních celách rostly s klesající výchozí koncentrací rhodaminu 6G. To lze přisoudit obsazování vazebných míst ve struktuře huminových kyselin s vyšší koncentrací barviva. Naopak s klesající koncentrací roztoku HK nebo mHK v přijímací komoře difúzních cel klesala hodnota K_{app} , což bylo dáno sníženým obsahem vazebných míst. U všech experimentů dialýzy v difúzních celách byla výsledná hodnota K_{app} nižší pro mHK, čímž se projevila modifikace karboxylových funkčních skupin. I přes drobné rozdíly ve vyhodnocených konstantách (K_S a K_{app}) způsobené modifikací, probíhala interakce mezi rhodaminem 6G a mHK velmi výrazně. Modifikované HK významně zhášely fluorescenci barviva a také pokles koncentrace rhodaminu 6G v průběhu dialyzačních experimentů s mHK byl značný. Z těchto výsledků vyplývá, že interakce nebyla primárně založena na karboxylových skupinách, ale že se na vazbě reaktantů podílely i jiné funkční skupiny ve struktuře huminových kyselin. Z toho také plyne kromě elektrostatických sil i možná existence jiných vazebných mechanismů.

Při měření směsi rhodaminu 6G a huminových kyselin proti odpovídajícímu roztoku HK nebo mHK v rámci diferenčních UV-VIS experimentů došlo ve spektru barviva k bathochromnímu posunu maxima absorpce a hypochromnímu efektu. Těmito výsledky byl potvrzen předpoklad přítomnosti π - π interakcí mezi rhodaminem 6G a huminovými kyselinami.

Zhášení fluorescence, dialýza v difúzních celách i diferenční UV-VIS spektroskopie se ukázaly jako vhodné techniky pro studium interakce mezi huminovými kyselinami a rhodaminem 6G a pro posouzení vlivu modifikace huminových kyselin na tuto interakci. Dosažené výsledky představují velkou motivaci a inspiraci pro pokračující výzkum v oblasti reaktivity huminových kyselin. V navazujících experimentech by mohlo být zajímavé se zaměřit také na změny v intenzitě fluorescence HK vlivem vazby s organickým iontem. Porovnání vazby barviva a HK z jiných zdrojů (např. standardy) pomocí technik využívanými v této práci představuje další možnost směru pokračujících experimentů. Slibnou perspektivu pro navazující studium interakcí HK reprezentuje také technika NMR, pomocí níž lze detailněji určit funkční skupiny ve struktuře HK podílejících se na interakci s organickými ionty.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SENN, T. L. a A. R. KINGMAN. *A review of humus and humic acids* [online]. 1973, Research Series No. 145, S. C. Agricultural Experiment Station, Clemson, South Carolina, [cit. 2016-12-27]. Dostupné z: <<http://andersonshumates.com/certifications-and-research/>>.
- [2] TAN, K. H. *Humic matter in soil and the environment: principles and controversies*. New York: Marcel Dekker, c2003. Books in soils, plants and the environment. ISBN 0-8247-4272-9.
- [3] STEINBERG, Ch. *Ecology of humic substances in freshwaters: determinants from geochemistry to ecological niches*. New York: Springer, 2003. ISBN 3-540-43922-6.
- [4] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Pôvod a štruktúra. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 262–268.
- [5] PITTER, P. *Hydrochemie*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [6] STEINBÜCHEL, A. a M. HOFRICHTER. *Biopolymers*. Chichester: Wiley-VCH, 2003. ISBN 35-273-0230-1.
- [7] DE MELO, B. A. G., F. L. MOTTA a M. H. A. SANTANA. Humic Acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering C*. 2016, r. 62, s. 962–974. ISSN 0928-4931.
- [8] SKOKANOVÁ, M. a K. DERCOVÁ. Humínové kyseliny. Interakcie humínových kyselín s kontaminantami. *Chemické listy*. 2008, č. 102, s. 338–345.
- [9] STEVENSON, F. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, c1994. ISBN 04-715-9474-1.
- [10] JANSEN, S. A., M. MALATY, S. NWABARA, E. JOHNSON, E. GHABBOUR, G. DAVIES a J. M. VARNUM. Structural modeling in humic acid. *Materials Science and Engineering C*. 1996, r. 4, s. 175–179. ISSN 0928-4931.
- [11] MORITA, H. Facile methylation of humic acids from organic soils. *Canadian journal of chemistry*. 1966, r. 44, s. 1593–1594.
- [12] ANĐELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. Spectroscopic and potentiometric studies on derivatized natural humic acid. *Analytical Science*. 2006, r. 22, č. 12, s. 1553–1558. ISSN 0910-6340.
- [13] ANĐELKOVIĆ, T., J. PEROVIĆ, M. PURENOVIĆ, S. BLAGOJEVIĆ, R. NIKOLIĆ, D. ANDJELKOVIĆ a A. BOJIĆ. A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with selectively blocked functional groups. *Eclética Química*. 2006, r. 31, č. 3, s. 39–46. ISSN 0100-4670.

- [14] LAMOUREUX, G. a C. AGÜERO. A comparison of several modern alkylating agents. *Arkivoc*. 2009, r. 1, s. 251–264. ISSN 1551-7012.
- [15] PICCOLO, A., P. CONTE a A. F. PATTI. O-Alkylation of a lignite humic acid by phase-transfer catalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006, r. 384, č. 4, s. 994–1001. ISSN 1618-2642.
- [16] VAN'T ERVE, T. J., R. H. RAUTIAINEN, L. W. ROBERTSON a G. LUTHE. Trimethylsilyldiazomethan: A safe non-explosive, cost effective and less-toxic reagent for phenol derivatization in GC applications. *Environment International*. 2010, r. 36, č. 8, s. 835–842. ISSN 0160-4120.
- [17] KLUČÁKOVÁ, M., M. KALINA, P. SEDLÁČEK a L. GRASSET. Reactivity and transport mapping of Cu(II) ions in humic hydrogels. *Journal of Soils and Sediments*. 2014, r. 14, č. 2, s. 368–376. ISSN 1439-0108.
- [18] PEÑA-MÉNDEZ, E. M., J. HAVEL a J. PATOČKA. Humic substances – compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. *Journal of applied biomedicine*. 2005, r. 3, s. 13–24. ISSN 1214-0287
- [19] CANELLAS, L. P., F. L. OLIVARES, N. O. AGUIAR, D. L. JONES, A. NEBBIOSO, P. MAZZEI a A. PICCOLO. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. 2015, r. 196, s. 15–27. ISSN 0304-4238.
- [20] STEINBÜCHEL, A. a R. H. MARCHESSAULT. *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-31154-8.
- [21] VAN RENSBURG, C. E. J. The antiinflammatory properties of humic substances: A mini review. *Phytotherapy Research*. 2015, r. 29, č. 6, s. 791–795. ISSN 0951418x.
- [22] SAUER, M., J. HOFKENS a J. ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles*. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [23] VALEUR, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-60024-8.
- [24] FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů :: Portál 1. lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze* [online]. 11. 2. 2009, poslední aktualizace 6. 2. 2013, [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <<http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-851-fluorescencni-spektroskopie-v-neurovedach>>. ISSN 1803-6619.
- [25] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springel, 2006. ISBN 978-0387-31278-1.
- [26] NAKASHIMA, K., M. MAKI, F. ISHIKAWA, T. YOSHIKAWA, Y. K. GONG a T. MIYAJIMA. Fluorescence studies on binding of pyrene and its derivatives to humic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, r. 67, č. 3–4, s. 930–935. ISSN 1386-1425.

- [27] ZEHENTBAUER, F. M., C. MORETTO, R. STEPHEN, T. THEVAR, J. R. GILCHRIST, D. POKRAJAC, K. L. RICHARD a J. KIEFER. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014, r. 121, s. 147–151. ISSN 1386-1425.
- [28] SHANKARLING, G. S. a K. J. JARAG. Laser Dyes. *Resonance: Journal of Science Education*. 2010, r. 15, č. 9, s. 804–818.
- [29] FISCHER, M. a J. GEORGES. Use of thermal lens spectrometry for the investigation of dimerization equilibria of rhodamin 6G in water and aqueous micellar solutions. *Spectrochimica Acta Part A*. 1997, r. 53, s. 1419–1430. ISSN 1386-1425.
- [30] GHASEMI, J., A. NIAZI a M. KUBISTA. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titrations and chemometric methods. *Spectrochimica Acta Part A*. 2005, r. 62, s. 649–656. ISSN 1386-1425.
- [31] ZHANG, X., Y. ZHANG a L. LIU. Fluorescence lifetimes and quantum yields of ten rhodamine derivatives: Structural effect on emission mechanism in different solvents. *Journal of Luminescence*. 2014, r. 145, s. 448–453. ISSN 0022-2313.
- [32] PALATÝ, Z. a B. BERNAUER. *Membránové procesy*. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2012. ISBN 978-80-7080-808-5.
- [33] HAYNIE, D. T. *Biological thermodynamics*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2008. ISBN 978-0-521-71134-0.
- [34] SMILEK, J. Stanovení difúzních koeficientů metodou difúzní cely. *CHEMPOINT: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. 2012 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/stanoveni-difuznich-koeficientu-metodou-difuzni-cely>
- [35] GUAN, X. H., G. H. CHEN a C. SHANG. Combining kinetic investigation with surface spectroscopic examination to study the role of aromatic carboxyl groups in NOM adsorption by aluminium hydroxide. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006, r. 301, č. 2, s. 419–427. ISSN 0021-9797.
- [36] GUAN, X. H., C. SHANG a G. H. CHEN. ATR-FTIR investigation of the role of phenolic groups in the interaction of some NOM model compounds with aluminium hydroxide. *Chemosphere*. 2006, r. 65, č. 11, s. 2074–2081. ISSN 0045-6535.
- [37] TERKHI, M. C., F. TALEB, P. GOSSART, A. SEMMOUD a A. ADDOU. Fourier transform infrared study of mercury interaction with carboxyl groups in humic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2008, r. 198, č. 2–3, s. 205–214. ISSN 1010-6030.
- [38] TANAKA, T. Functional groups and reactivity of size-fractionated Aldrich humic acid. *Thermochimica Acta*. 2012, r. 532, s. 60–64. ISSN 0040-6031.
- [39] SCHMEIDE, K., S. SACHS, M. BUBNER, T. REICH, K. H. HEISE a G. BERNHARD. Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural

and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, r. 351, s. 133–140. ISSN 0020-1693.

- [40] ANĐELKOVIĆ, T., R. NIKOLIĆ, A. BOJIĆ, D. ANĐELKOVIĆ a G. NIKOLIĆ. Binding of cadmium to soil humic acid as a function of carboxyl group content. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2010, r. 29, č. 2, s. 215–224. ISSN 1857-5552.
- [41] KLUČÁKOVÁ, M. a M. KALINA. Diffusivity of Cu(II) ions in humic gels – influence of reactive functional groups of humic acids. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, r. 483, s. 162–170. ISSN 0927-7757.
- [42] SMILEK, J., P. SEDLÁČEK, M. KALINA a M. KLUČÁKOVÁ. On the role of humic acids' carboxyl groups in the binding of charged organic compounds. *Chemosphere*. 2015, r. 138, s. 503–510. ISSN 0045-6535.
- [43] SHENG, G. P., M. L. ZHANG a H. Q. YU. Quantification of the interactions between a cationic dye and humic substances in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2009, r. 331, č. 1, s. 15–20. ISSN 0021-9797.
- [44] JANOŠ, P., P. ŠEDIVÝ, M. RÝZNAROVÁ a S. GRÖTSCHELOVÁ. Sorption of basic and acid dyes from aqueous solution onto oxihumolit. *Chemosphere*. 2005, r. 59, č. 6, s. 881–886. ISSN 0045-6535.
- [45] ZERMANE, F., B. CHEKNANE, J. P. BASLY, O. BOURAS a M. BAUDU. Influence of humic acids on the adsorption of Basic Yellow 28 dye onto an iron organo-inorgano pillared clay and two Hydrous Ferric Oxides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013, r. 395, s. 212–216. ISSN 0021-9797.
- [46] ZHANG, X., P. ZHANG, Z. WU, L. ZHANG, G. ZENG a CH. ZHOU. Adsorption of methylene blue onto humic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013, r. 435, s. 85–90. ISSN 0927-7757.
- [47] HAFUKA, A., Q. DING, H. YAMAMURA, K. YAMADA a H. SATOH. Interactions of dissolved humic substances with oppositely charged fluorescent dyes for tracer techniques. *Water Research*. 2015, r. 85, s. 193–198. ISSN 0043-1354.
- [48] SEDLÁČEK, P., J. SMILEK a M. KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – 2. Non-stationary diffusion experiments. *Reactive and Functional Polymers*. 2014, r. 75, s. 41–50. ISSN 1381-5148.
- [49] ZHANG, H., M. YIN, J. SHI a Y. WANG. Quest for binding mode of malachite green with humic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2015, r. 1081, s. 268–273. ISSN 0022-2860.
- [50] ZANINI, G. P., M. J. AVENA, S. FIOL a F. ARCE. Effects of pH and electrolyte concentration on the binding between a humic acid and an oxazine dye. *Chemosphere*. 2006, r. 63, č. 3, s. 430–439. ISSN 0045-6535.

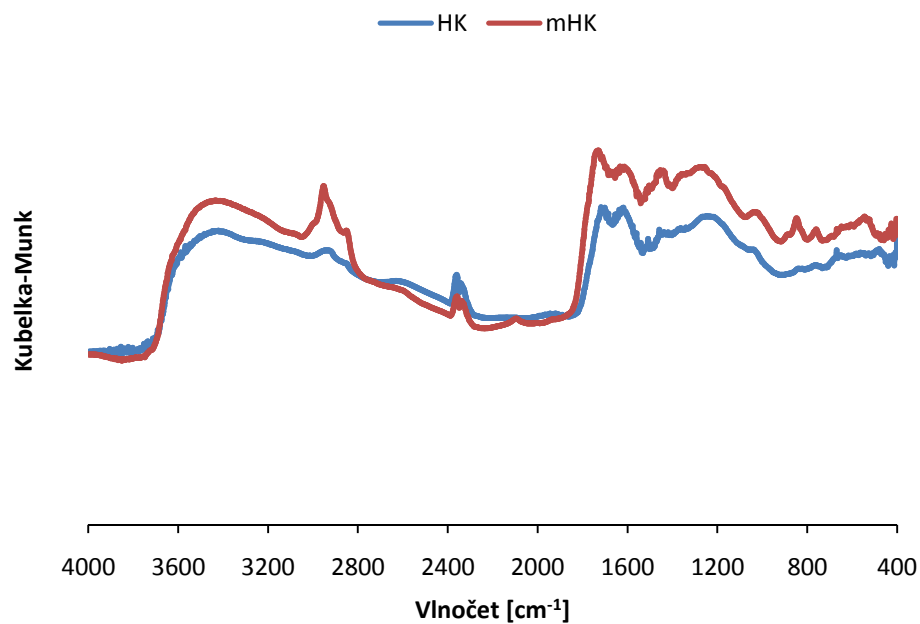
- [51] HAYES, M. H. B. Adsorption of triazine herbicides on soil organic matter, including a short review on soil organic matter chemistry. *Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides*. Springer-Verlag New York, 1970. s. 131-174.
- [52] GEVAO, B., K. T. SEMPLE a K. C. JONES. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*. 2000, r. 108, s. 3–14. ISSN 0269-7491.
- [53] ROLDÁN, M. L., G. CORRADO, O. FRANCIOSO a S. SANCHEZ-CORTES. Interaction of soil humic acids with herbicide paraquat analyzed by surface-enhanced Raman scattering and fluorescence spectroscopy on silver plasmonic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*. 2011, r. 699, č. 1, s. 87–95. ISSN 0003-2670.
- [54] SENESI, N., V. D’ORAZIO a T. M. MIANO. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*. 1995, r. 66, s. 273–283. ISSN 0016-7061.
- [55] LANDGRAF, M. D., S. C. DA SILVA a M. O. de O. REZENDE. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. *Analytica Chimica Acta*. 1998, r. 368, s. 155–164. ISSN 0003-2670.
- [56] IGLESIAS, A., R. LÓPEZ, D. GONDAR, J. ANTELO, S. FIOL a F. ARCE. Effect of pH and ionic strength on the binding of paraquat and MCPA by soil fulvic and humic acids. *Chemosphere*. 2009, r. 76, č. 1, s. 107–113. ISSN 0045-6535.
- [57] IGLESIAS, A., R. LÓPEZ, D. GONDAR, J. ANTELO, S. FIOL a F. ARCE. Adsorption of MCPA on goethite and humic acid-coated goethite. *Chemosphere*. 2010, r. 78, č. 11, s. 1403–1408. ISSN 0045-6535.
- [58] IGLESIAS, A., R. LÓPEZ, D. GONDAR, J. ANTELO, S. FIOL a F. ARCE. Adsorption of paraquat on goethite and humic acid-coated goethite. *Journal of Hazardous Material*. 2010, r. 183, č. 1-3, s. 664–668. ISSN 0304-3894.
- [59] JUNG, A.-V., C. FROCHOT a J.-L. BERSILLON. Fluorescence spectroscopy as a specific tool for the interaction study of two surfactants with natural and synthetic organic compounds. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2015, r. 481, s. 567–576. ISSN 0927-7757.
- [60] NAKASHIMA, K., M. MAKI, F. ISHIKAWA, T. YOSHIKAWA, Y.-K. GONG a T. MIYAJIMA. Fluorescence studies on binding of pyrene and its derivatives to humic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, r. 67, č. 3-4, s. 930–935. ISSN 1386-1425.
- [61] KARTHIKEYAN, K. G. a J. CHOROVER. Humic acid complexation of basic and neutral polycyclic aromatic compounds. *Chemosphere*. 2002, r. 48, s. 955–964. ISSN 0045-6535.
- [62] MASZKOWSKA, J., M. WAGIL, K. MIODUSZEWSKA, J. KUMIRSKA, P. STEPNOWSKI a A. BIAŁK-BIELIŃSKA. Thermodynamic studies for adsorption of ionizable pharmaceuticals onto soil. *Chemosphere*. 2014, r. 111, s. 568–574. ISSN 0045-6535.

- [63] GUO, T., B. TU, J. GE, CH. YANG, X. SONG a Z. DANG. Sorption of tylosin and sulfamethazine on solid humic acid. *Journal of Environmental Science*. 2016, r. 43, s. 208–215. ISSN 1001-0742.
- [64] ZHANG, Q., L. ZHAO, Y. DONG a G. HUANG. Sorption of norfloxacin onto humic acid extracted from weathered coal. *Journal of Environmental Management*. 2012, r. 102, s. 165–172. ISSN 0301-4797.
- [65] FRYŠOVÁ, E. *Studium strukturních a termodynamických aspektů interakcí huminových látek s iontovými organickými sloučeninami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 53 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [66] SEDLÁČEK, P., J. SMILEK a M. KLUČÁKOVÁ. How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2013, r. 73, s. 1500–1509. ISSN 1381-5148.
- [67] KALINA, M. Využití difúzních technik při studiu reaktivity biokoloidů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 165 s. (přílohy 21 s.) Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

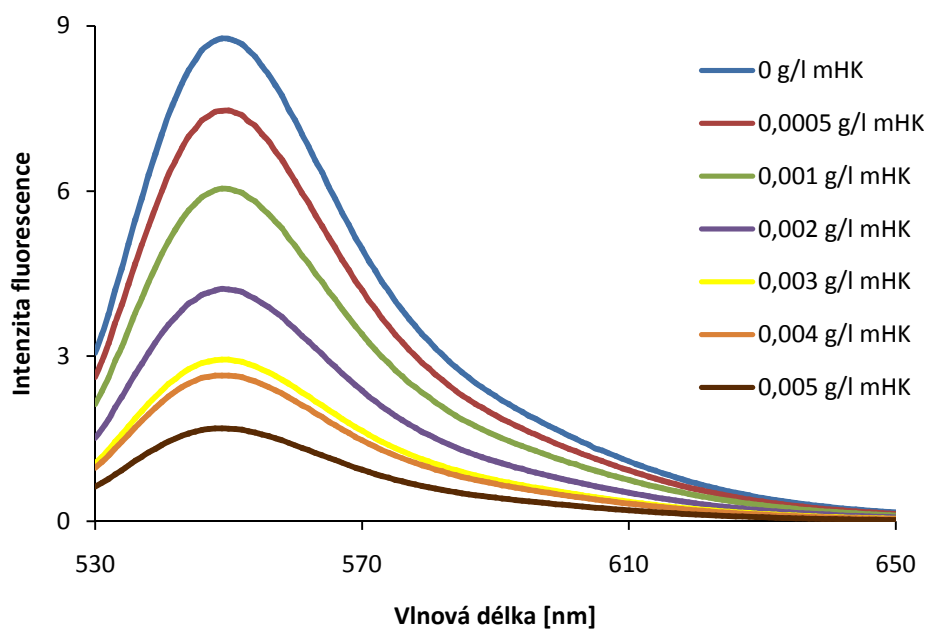
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HL	Huminové látky
FK	Fulvinové kyseliny
HK	Huminové kyseliny
HU	Huminy
TMS-DM	Trimethylsilyl-diazomethan
TCSPC	Time-Correlated-Single-Photon-Counting
CFD	Constant Function Discriminator
TAC	Time-to-Amplitude Convertor
PGA	Programmable Gain Amplifier
ADC	Analog-to-Digital Converter
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná část spektra
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
MCPA	Kyselina (4-chlor-2-methylfenoxy)octová
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
NPE	Nonylfenylethoxyl
NMR	Nukleární magnetická rezonance
mHK	Methylované huminové kyseliny
TGA	Termogravimetrická analýza
ATR	Zeslabená totální reflektance
DRIFTS	Difúzní reflektance
SEC-MALS	Velikostně vylučovací chromatografie s detekcí pomocí víceúhlového rozptylu světla
MW	Molekulová hmotnost
Rh6G	Rhodamin 6G
S_0	Základní singletový stav
S_{1-n}	Excitovaný singletový stav
T_1	Tripletový stav
F_{corr}	Korigovaná intenzita fluorescence
F_{obs}	Experimentálně získaná intenzita fluorescence
OD_{ex}	Optická hustota při excitační vlnové délce
OD_{em}	Optická hustota při emisní vlnové délce
A_{ex}	Absorbance při excitační vlnové délce
A_{em}	Absorbance při emisní vlnové délce
F_0	Intenzita fluorescence bez přítomnosti zhášedce
F	Intenzita fluorescence v přítomnosti zhášedce
k_q	Bimolekulární zhášecí konstanta
τ_0	Doba života fluorescence bez přítomnosti zhášedce
$[Q]$	Koncentrace zhášedce
K_D	Stern-Volmerova zhášecí konstanta
K_S	Asociační konstanta vzniku komplexu
K	Rovnovážná konstanta
K_{app}	Zdánlivá rovnovážná konstanta

10 PŘÍLOHY



Příloha 1: FT-IR spektra HK a mHK (technika DRIFTS)



Příloha 2: Pokles korigované intenzity fluorescence rhodaminu 6G s rostoucí koncentrací mHK



Příloha 3: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,05 g/l – začátek experimentu



Příloha 4: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,05 g/l – stav rovnováhy



Příloha 5: mHK 0,1 g/l proti Rh6G 0,05 g/l – začátek experimentu



Příloha 6: mHK 0,1 proti Rh6G 0,05 g/l – stav rovnováhy



Příloha 7: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,025 g/l – začátek experimentu



Příloha 8: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,025 g/l – stav rovnováhy



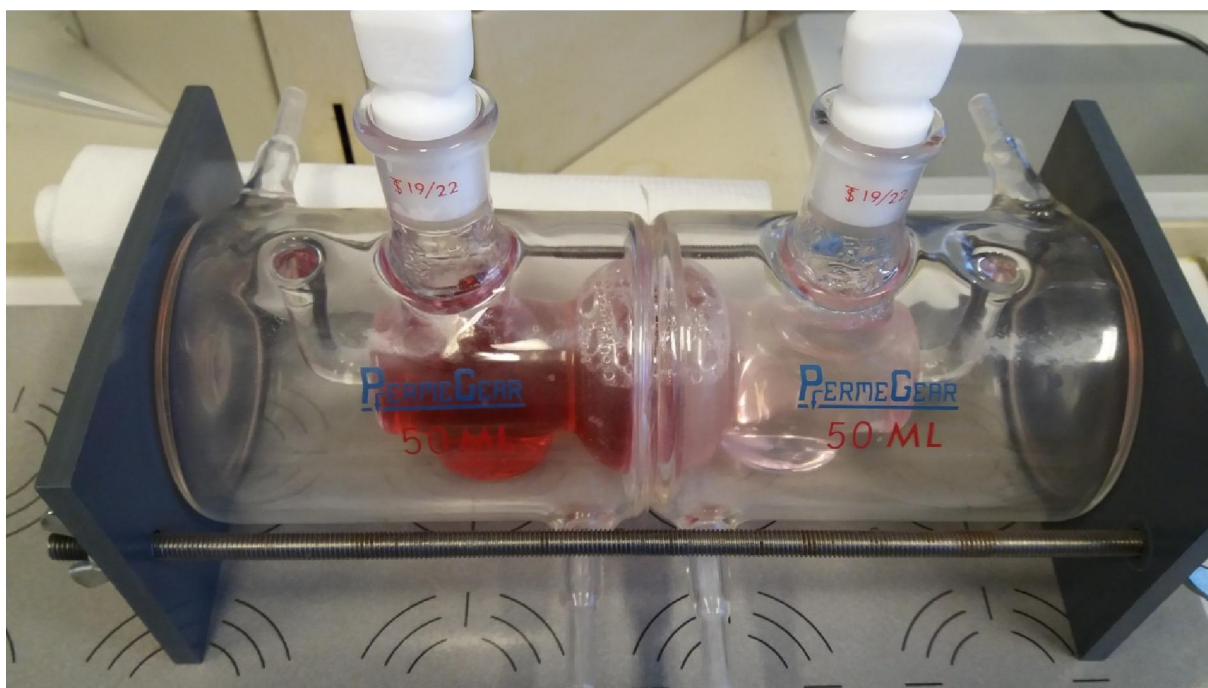
Příloha 9: mHK 0,1 g/l proti Rh6G 0,025 g/l – začátek experimentu



Příloha 10: mHK 0,1 g/l proti Rh6G 0,025 g/l – stav rovnováhy



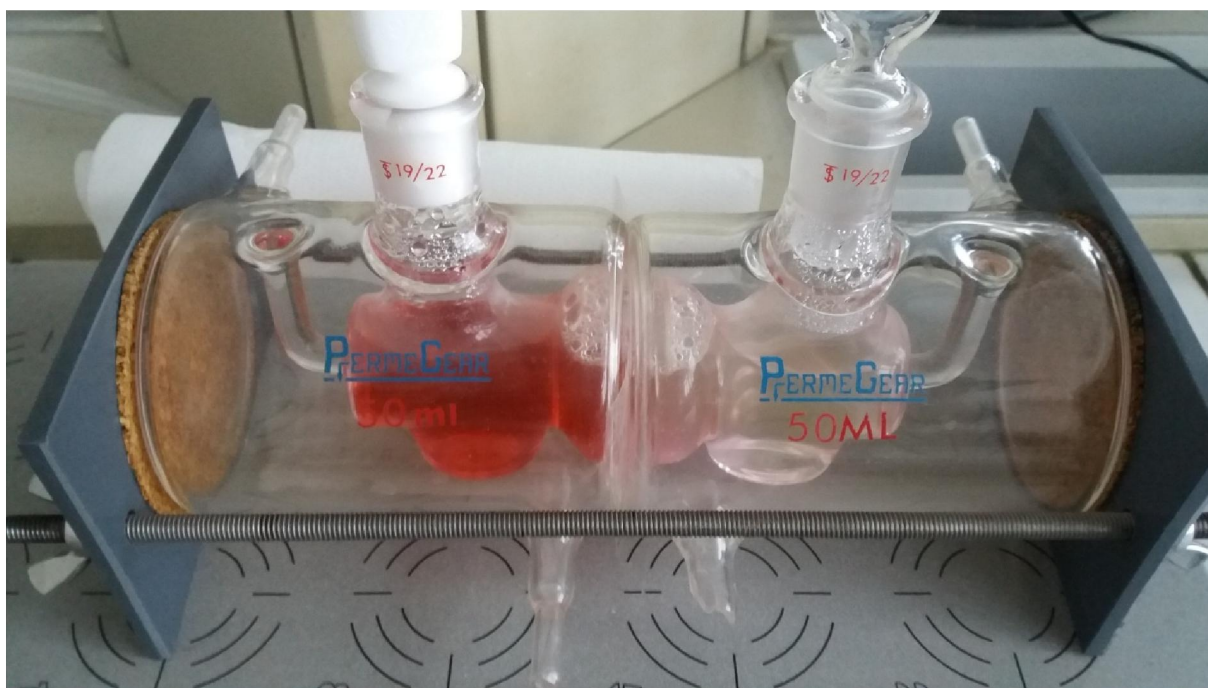
Příloha 11: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – začátek experimentu



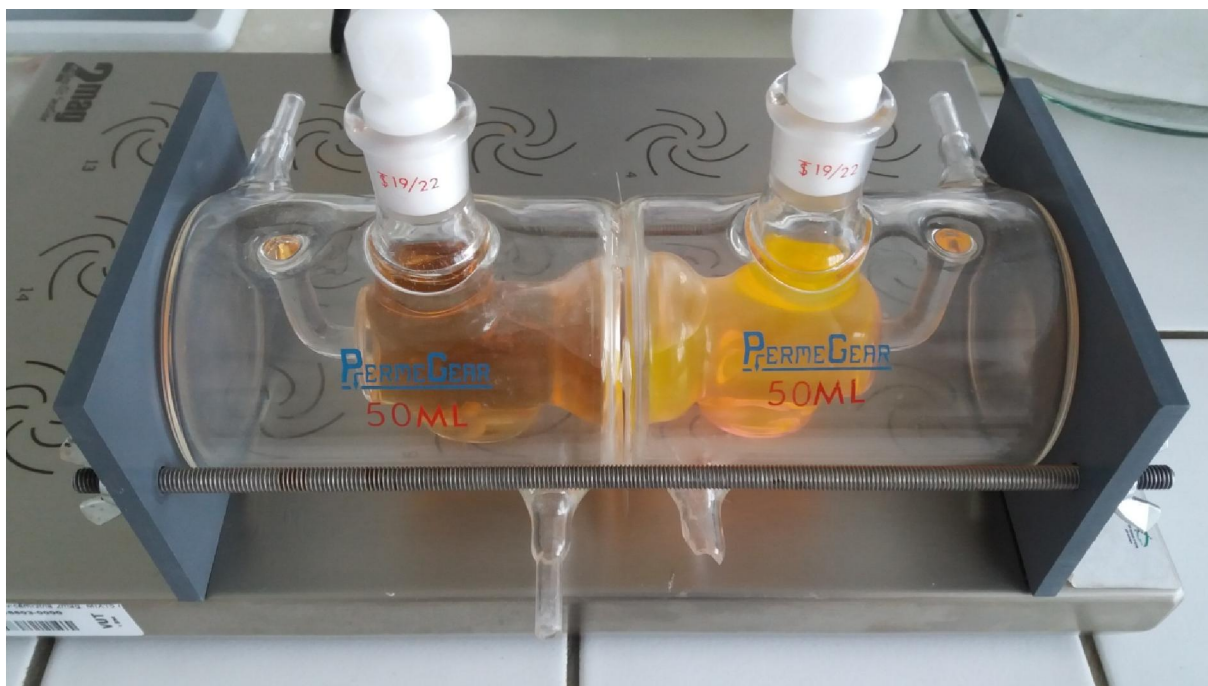
Příloha 12: HK 0,1 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – stav rovnováhy



Příloha 13: mHK 0,1 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – začátek experimentu



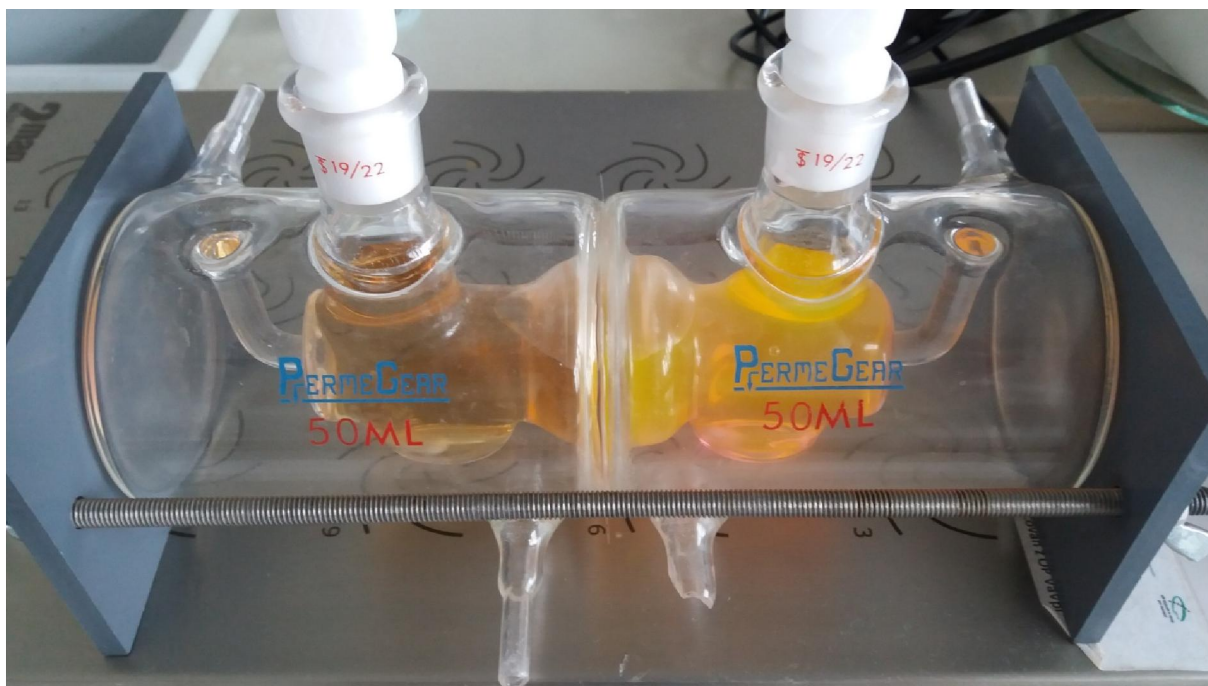
Příloha 14: mHK 0,1 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – stav rovnováhy



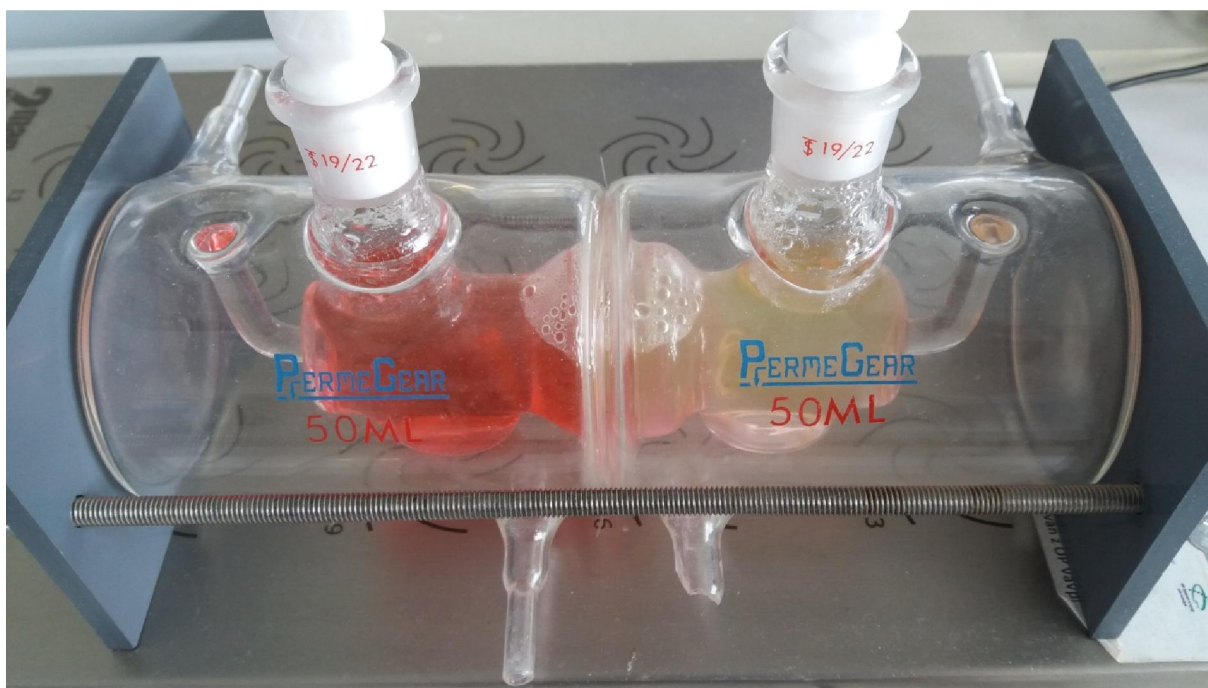
Příloha 15: HK 0,05 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – začátek experimentu



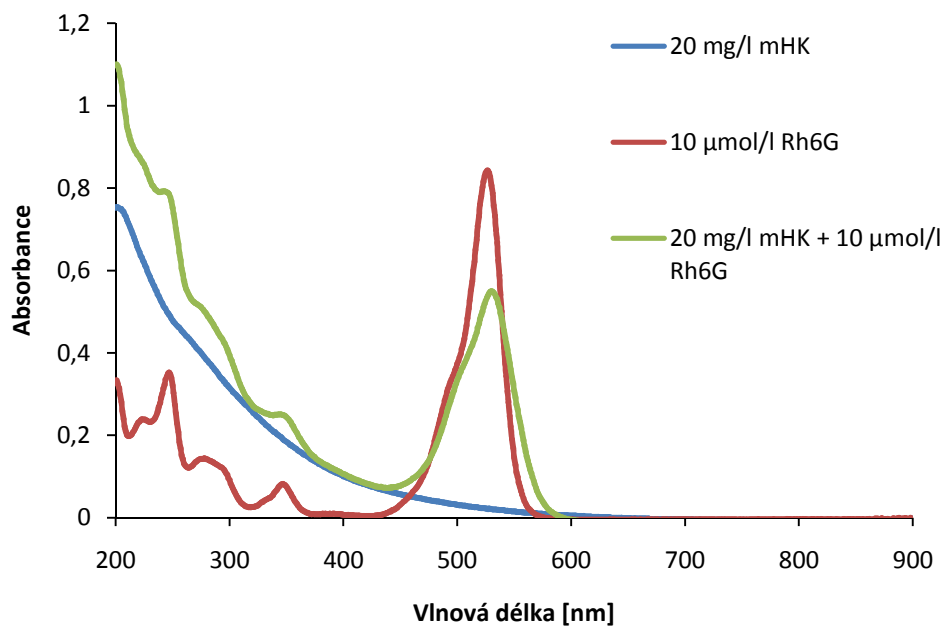
Příloha 16: HK 0,05 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – stav rovnováhy



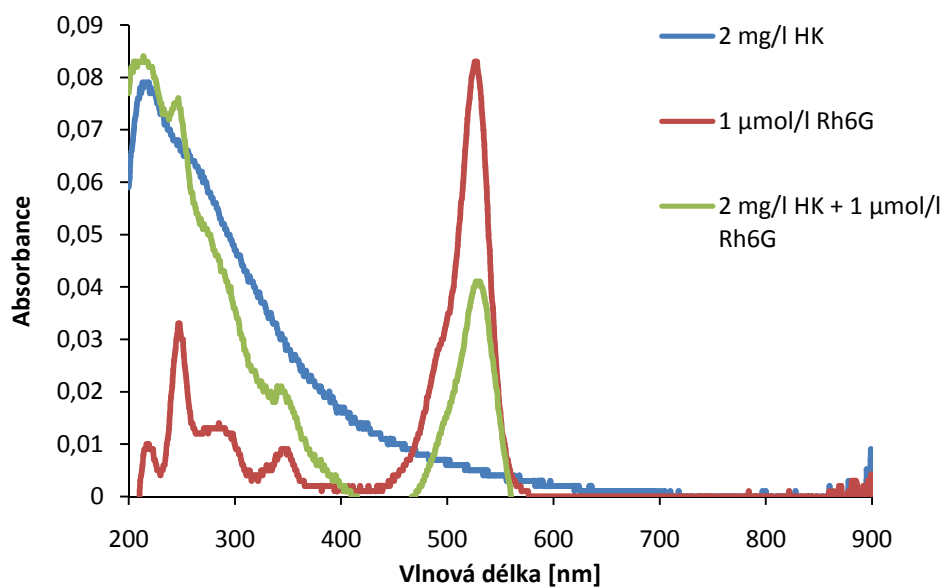
Příloha 17: mHK 0,05 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – začátek experimentu



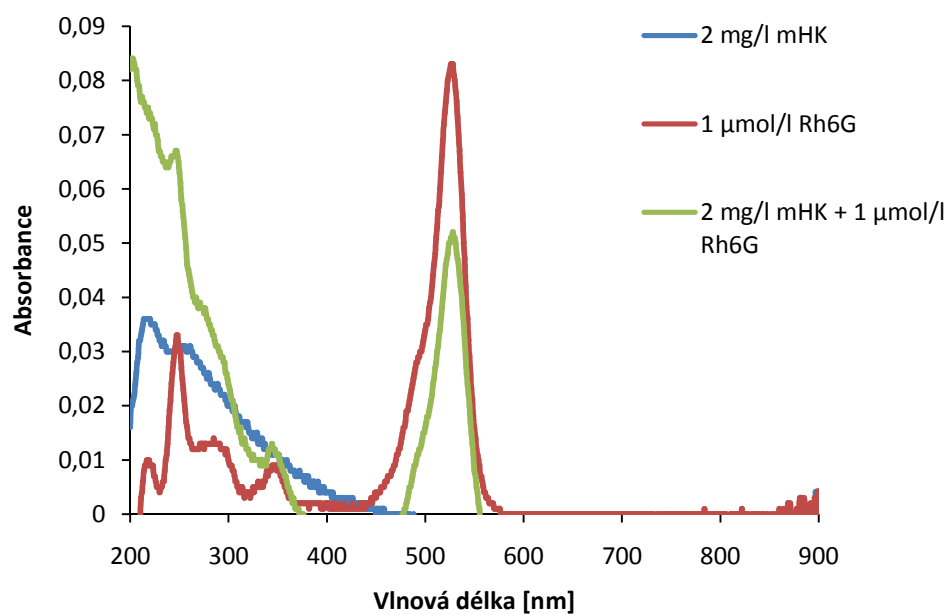
Příloha 18: mHK 0,05 g/l proti Rh6G 0,01 g/l – stav rovnováhy



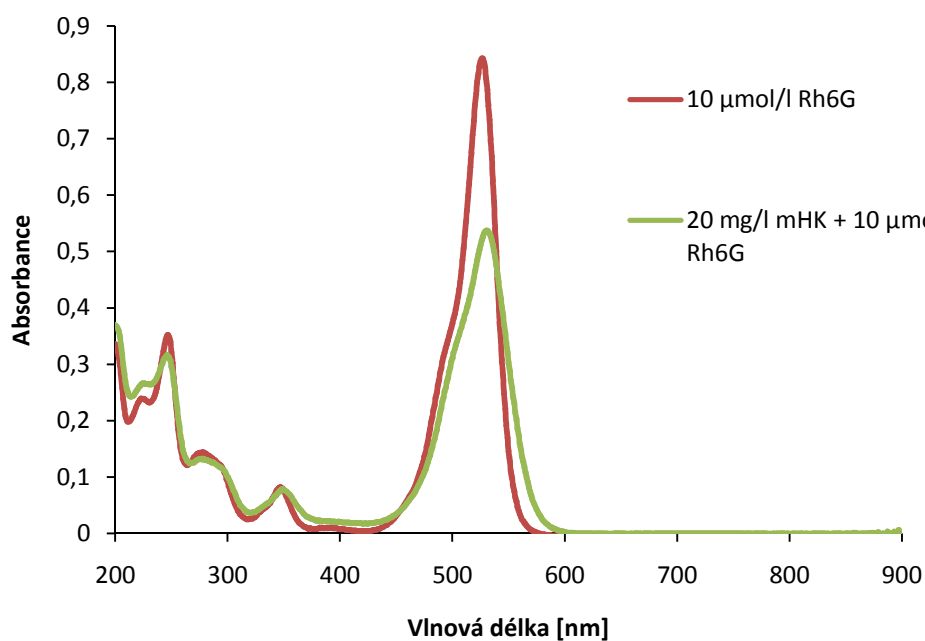
Příloha 19: UV-VIS spektra měřená proti fosfátovému pufru, vyšší koncentrace roztoků, mHK



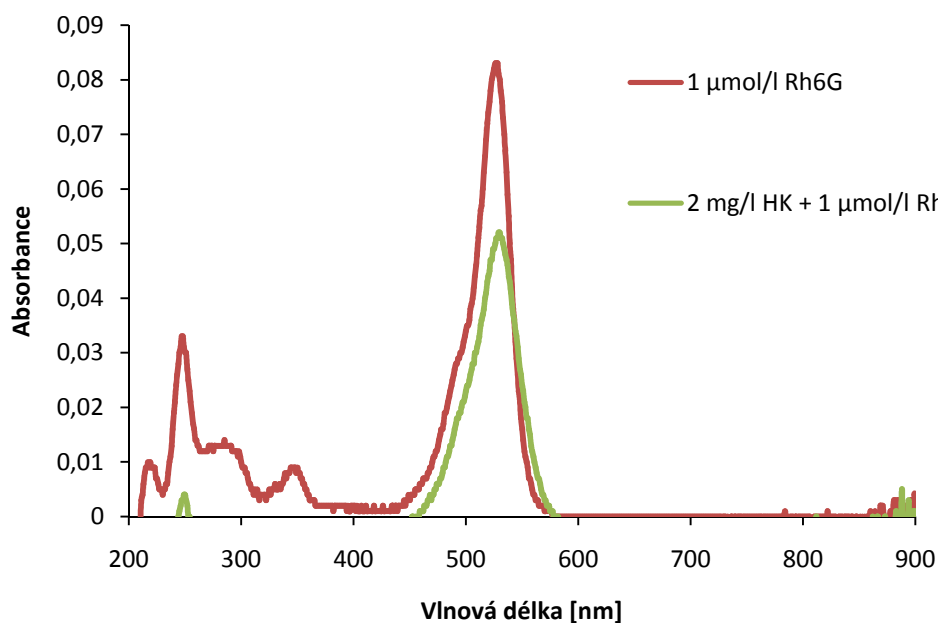
Příloha 20: UV-VIS spektra měřená proti fosfátovému pufru, nižší koncentrace roztoků, HK



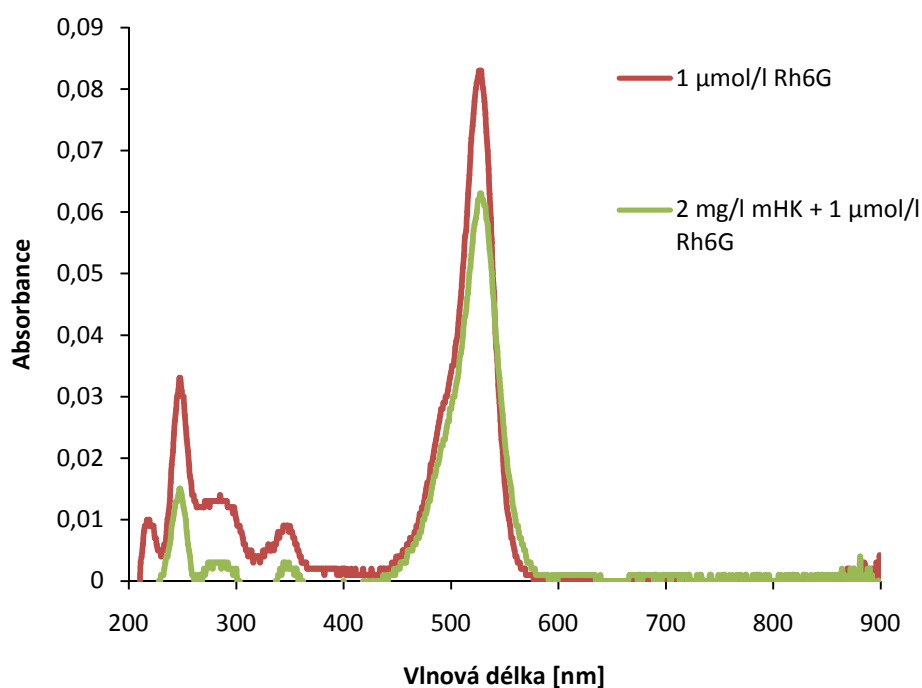
Příloha 21: UV-VIS spektra měřená proti fosfátovému pufru, nižší koncentrace roztoků, mHK



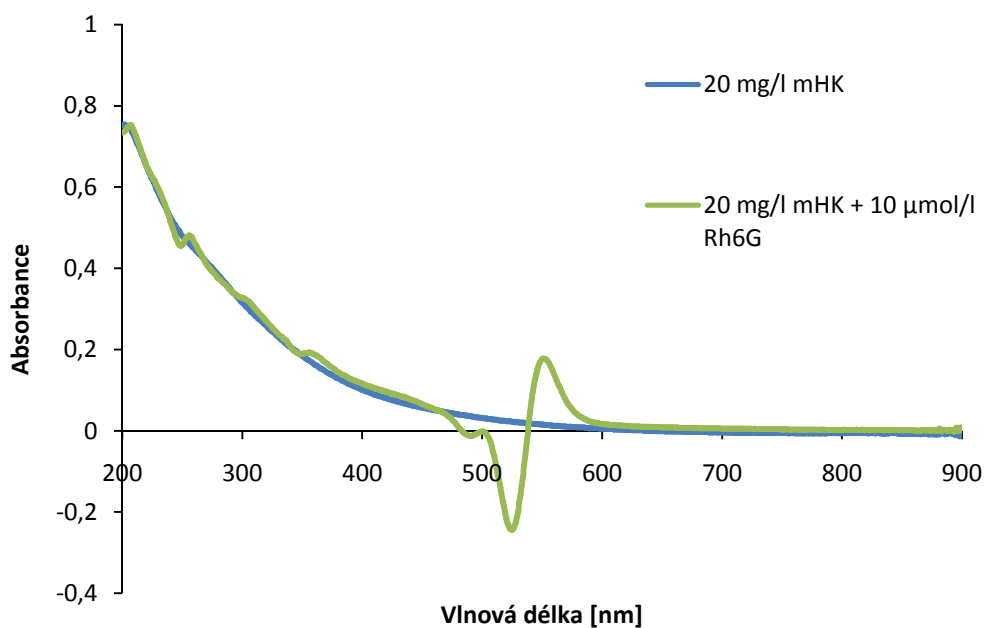
Příloha 22: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky Rh6G s diferenčním spektrem složky Rh6G o stejné koncentraci ve směsi s mHK (spektrum směsi měřeno proti roztoku mHK o odpovídající koncentraci)



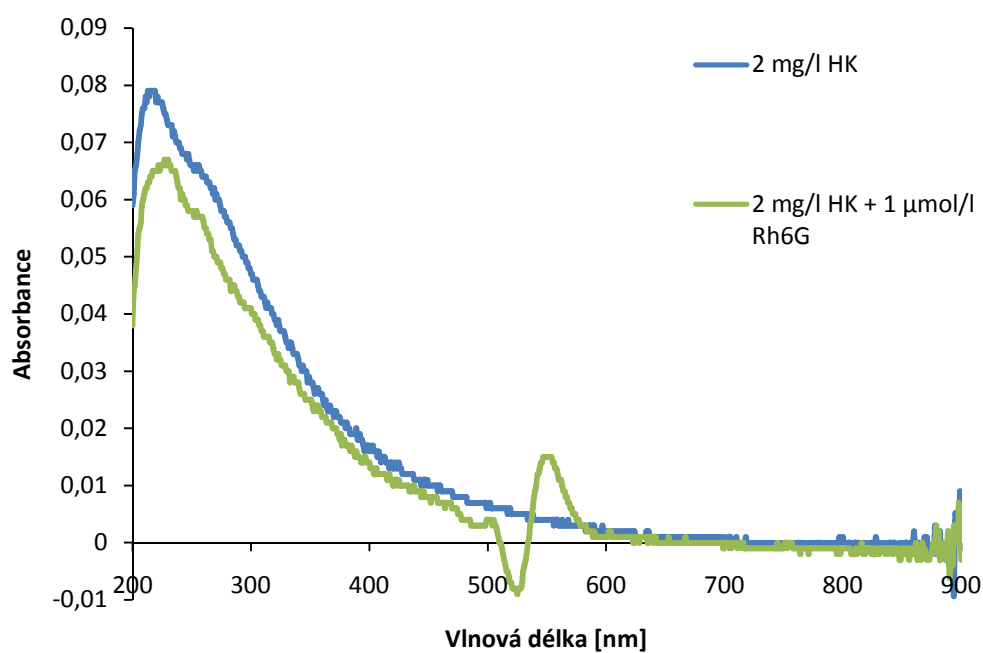
Příloha 23: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky Rh6G s diferenčním spektrem složky Rh6G o stejné koncentraci ve směsi s HK (spektrum směsi měřeno proti roztoku HK o odpovídající koncentraci)



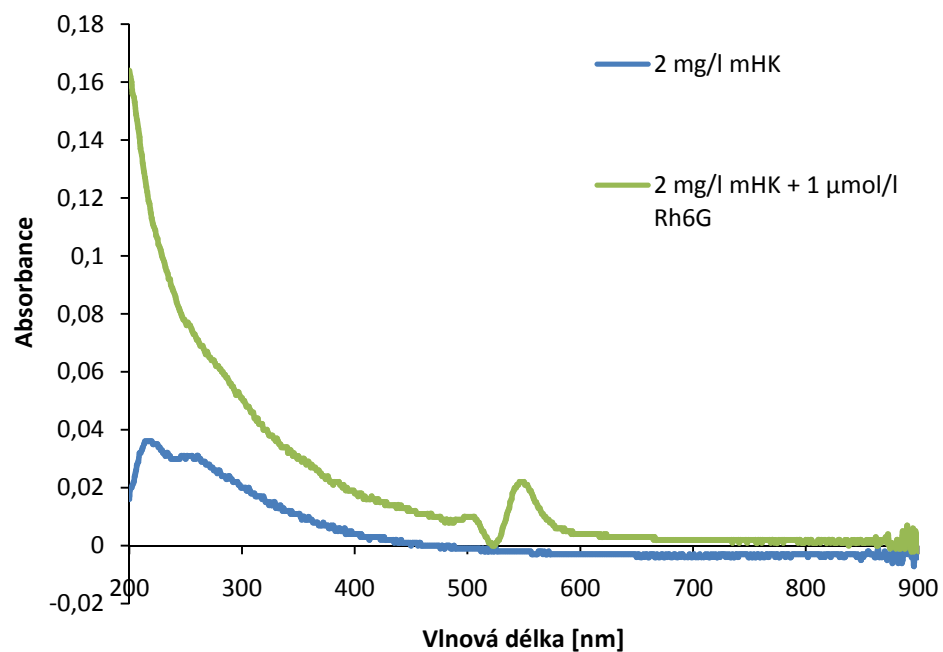
Příloha 24: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky Rh6G s diferenčním spektrem složky Rh6G o stejné koncentraci ve směsi s mHK (spektrum směsi měřeno proti roztoku mHK o odpovídající koncentraci)



Příloha 25: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky mHK s diferenčním spektrem složky mHK o stejné koncentraci ve směsi s Rh6G (spektrum směsi měřeno proti roztoku Rh6G o odpovídající koncentraci)



Příloha 26: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky HK s diferenčním spektrem složky HK o stejné koncentraci ve směsi s Rh6G (spektrum směsi měřeno proti roztoku Rh6G o odpovídající koncentraci)



Příloha 27: Porovnání UV-VIS spektra čisté složky mHK s diferenčním spektrem složky mHK o stejné koncentraci ve směsi s Rh6G (spektrum směsi měřeno proti roztoku Rh6G o odpovídající koncentraci)